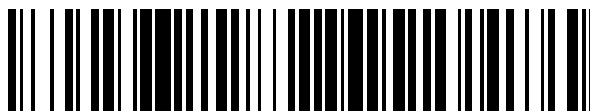


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 230**

51 Int. Cl.:

C12N 9/18 (2006.01)

A61L 2/23 (2006.01)

C11D 3/00 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2009 PCT/US2009/059231**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10039959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 09793244 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2342326**

54 Título: **Estabilización de perhidrolasas con excipientes**

30 Prioridad:

03.10.2008 US 102505 P

03.10.2008 US 102512 P

03.10.2008 US 102514 P

03.10.2008 US 102520 P

03.10.2008 US 102531 P

03.10.2008 US 102539 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2019

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)**

**Chestnut Run Plaza, 974 Center Road, P.O. Box
2915**

Wilmington, DE 19805, US

72 Inventor/es:

DICOSIMO, ROBERT;

BEN-BASSAT, ARIE;

PAYNE, MARK, S. y

ZOLANDZ, RAYMOND, RICHARD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 735 230 T3

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

DESCRIPCIÓN

Estabilización de perhidrolasas con excipientes

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de la síntesis enzimática de perácidos y la catálisis de enzimas in situ. Al menos un ácido peroxicarboxílico se produce en suficientes concentraciones como para ser eficaz para la desinfección o higienización de superficies, esterilización de instrumentos médicos, esterilización de equipos de procesamiento de alimentos, y adecuado para usar en aplicaciones de productos textiles y cuidado de la ropa tales como blanqueo, decoloración, desodorización, desinfección o higienización.

Antecedentes de la invención

10 Se ha descrito que las composiciones de perácidos son agentes antimicrobianos eficaces. Se han descrito métodos para limpiar, desinfectar y/o higienizar superficies duras, productos de carne, tejidos de plantas vivas y dispositivos médicos, contra el crecimiento microbiano indeseable (p. ej., patente de EE.UU. 6.545.047; patente de EE.UU. 6.183.807, patente de EE.UU. 6.518.307, patente de EE.UU. 5.683.724 y publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2003/0026846). Se ha descrito que los perácidos son útiles para preparar composiciones blanqueadoras para aplicaciones de detergentes para ropa (patente de EE.UU. 3.974.082; patente de EE.UU. 5.296.161 y patente de EE.UU. 5.364.554).

15 Los perácidos se pueden preparar por la reacción química de un ácido carboxílico y peróxido de hidrógeno (véase, Organic Peroxides, Daniel Swern, ed., Vol. 1, pág. 313-516; Wiley Interscience, New York, 1971). La reacción normalmente es catalizada por un ácido inorgánico fuerte, tal como ácido sulfúrico concentrado. La reacción de peróxido de hidrógeno con un ácido carboxílico es una reacción de equilibrio, y la producción de perácido se favorece por el uso de un exceso de concentración de peróxido y/o ácido carboxílico, o por la eliminación de agua.

20 Algunos desinfectantes o agentes blanqueantes basados en perácido están compuestos de una mezcla en equilibrio de perácido, peróxido de hidrógeno y el correspondiente ácido carboxílico. Una desventaja de estos sistemas de limpieza de perácidos comerciales es que el perácido a veces es inestable en disolución a lo largo del tiempo. Una forma de superar el problema de estabilidad es generar el perácido antes de usar combinando múltiples componentes de reacción que son individualmente estables durante periodos de tiempos prolongados. Preferiblemente, los componentes de reacción individuales son fáciles de almacenar, relativamente seguros de manipular, y pueden producir rápidamente una concentración eficaz de perácido tras la mezcla.

25 Se ha descrito recientemente que la familia CE-7 de carbohidrato esterasas tiene actividad de perhidrolasa. Se ha demostrado que estas enzimas "perhidrolasas" son particularmente eficaces para producir perácidos a partir de una variedad de sustratos ésteres de ácidos carboxílico cuando se combinan con una fuente de peróxígeno (véase el documento WO2007/070609 y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. nº 2008/0176299 y 2008/176783 de DiCosimo et al.). Se ha demostrado que algunos miembros de la familia CE-7 de carbohidrato esterasas tiene actividad perhidrolítica suficiente para producir 4000 - 5000 ppm de ácido peracético a partir de ésteres de acetilo de alcoholes, dioles y gliceroles en 1 minuto y hasta 9000 ppm entre 5 minutos y 30 minutos una vez que se han mezclado los componentes de la reacción (DiCosimo et al., publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2009/0005590).

30 El sistema de generación enzimática de perácidos descrito por el documento U.S. 2009/0005590 de DiCosimo et al., se basa típicamente en el uso de múltiples componentes de reacción que permanecen separados hasta que se necesita la disolución de perácido. El uso de este planteamiento supera los problemas de inestabilidad del perácido asociados con el almacenamiento de muchos desinfectantes y agentes blanqueantes basados en perácidos. Sin embargo, siguen sin abordarse formulaciones específicas que proporcionen estabilidad a largo plazo de actividad de perhidrolasa cuando se usan formulaciones multicomponentes que comprenden carbohidrato esterasas CE-7. Es de particular preocupación la estabilidad en el almacenamiento a largo plazo de una enzima CE-7 que tiene actividad de perhidrólisis cuando se almacena en un líquido o disolvente orgánico que tiene un log P (es decir, el logaritmo del coeficiente de reparto de una sustancia entre octanol y agua, donde P es igual a $[\text{soluto}]_{\text{octanol}}/[\text{soluto}]_{\text{agua}}$) menor de dos. Varios de los sustratos ésteres orgánicos descritos previamente por DiCosimo et al. tienen valores de log P menores de dos.

35 Los líquidos o disolventes orgánicos pueden ser perjudiciales para la actividad de enzimas, bien cuando las enzimas se suspenden directamente en líquidos o disolventes orgánicos, o bien cuando se usan líquidos o disolventes de una sola fase orgánica/acuosa miscible. Dos publicaciones de la bibliografía que revisan los efectos de disolventes orgánicos en la actividad y estructura de enzimas son: (a) C. Laane et al., *Biotechnol. Bioeng.* 30:81-87 (1987) y (b) Cowan, D.A. y Plant, A., *Biocatalysis in Organic Phase Systems*, Ch. 7 en *Biocatalysis at Extreme Temperatures*, Kelly, R.W.W. y Adams, M., eds., *Amer. Chem. Soc. Symposium Series*, Oxford University Press, New York, NY, pág. 86-107 (1992). Cowan y Plant, véase antes, indican (en la página 87) que la técnica en general reconoce que hay poco valor o no hay valor en el uso de disolventes orgánicos que tienen un log P ≤ 2 para estabilizar enzimas intracelulares en un sistema de fase orgánica. Los disolventes orgánicos que tiene un log P entre dos y cuatro se

pueden usar según el caso dependiendo de la estabilidad de la enzima, y los que tienen un $\log P > 4$ en general son útiles en sistemas de fase orgánica.

5 Cowan y Plant, véase antes, indican además (en la página 91) que el efecto de la exposición directa de una enzima disuelta en un disolvente orgánico-acuoso de una sola fase depende de la concentración de disolventes, las interacciones de disolvente/grupos de superficie de la enzima, e interacciones de disolvente/cubierta de hidratación de la enzima. Debido a que el valor de $\log P$ del disolvente debe ser suficientemente bajo de modo que el disolvente sea completamente miscible con la fase acuosa para producir una sola fase, un disolvente orgánico-acuoso de una sola fase que contiene un disolvente orgánico de $\log P$ bajo normalmente tiene un efecto negativo en la estabilidad enzimática, excepto en aplicaciones de concentración baja de disolvente orgánico. Se describe que la triacetina tiene un $\log P$ de 0,25 (Y. M. Gunning, et al., *J. Agric. Food Chem.* 48:395-399 (2000)), similar al del etanol ($\log P$ -0,26) e isopropanol ($\log P$ 0,15) (Cowan y Plant); por lo tanto se esperaría que el almacenamiento del polvo de enzima en triacetina diera como resultado la pérdida inaceptable de actividad, así como el uso de codisolventes adicionales con $\log P < 2$ (p. ej., ciclohexanona, $\log P = 0,94$) (Cowan y Plant); 1,2-propanodiol, $\log P = -1,41$ (Gunning, et al.); 1,3-propanodiol, $\log P = -1,3$ (S-J. Kuo, et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:1427-1433 (1996); éter butílico del dietilenglicol, $\log P = 0,56$ (N. Funasaki, et al., *J. Phys. Chem.* 88:5786-5790 (1984); trietilenglicol, $\log P = -1,75$ (L. Braeken, et al., *ChemPhysChem* 6:1606-1612 (2005)).

10 Por lo tanto, el problema que se tiene que resolver es formular un producto usando una mezcla de una enzima generadora de perácido en un sustrato éster orgánico usado para la producción de perácidos, donde la enzima retiene actividad de perhidrolasa significativa, incluso cuando se almacena en una mezcla con el sustrato éster de ácido carboxílico.

Resumen de la invención

25 El problema expuesto se ha resuelto por el descubrimiento de un procedimiento para el secado por atomización de una formulación acuosa que comprende al menos una enzima estructuralmente clasificada como una enzima CE-7 y que tiene actividad de perhidrólisis, en donde la formulación comprende además un excipiente oligosacárido que estabiliza la actividad de perhidrolasa cuando la formulación secada por atomización (un polvo de enzima) se combina con un sustrato éster de ácido carboxílico usando para la producción de perácidos.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para estabilizar la actividad de perhidrólisis de una enzima cuando está presente en una formulación compuesta de dicha enzima y un éster de ácido carboxílico, comprendiendo el procedimiento:

30 (a) proporcionar una formulación acuosa que comprende:

(i) al menos una enzima estructuralmente clasificada como una enzima CE-7 y que tiene actividad de perhidrólisis y un motivo identificativo que comprende:

(i) un motivo RGQ en los restos de aminoácidos 118-120

(ii) un motivo GXSQG en los restos de aminoácidos 179-183; y

35 (iii) un motivo HE en los restos de aminoácidos 298-299

cuando se alinea con la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1 usando un método de alineamiento de CLUSTAL W;

(ii) al menos un excipiente oligosacárido que tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1250 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 9000; y

40 (iii) opcionalmente al menos un tensioactivo;

(b) secar por atomización la formulación acuosa de (a) para producir un polvo de enzima que comprende la al menos una enzima de (i) y el al menos un excipiente oligosacárido de (ii); y

(c) combinar el polvo de enzima secado por atomización de (b) con un éster de ácido carboxílico para producir dicha formulación, que comprende menos de 2000 ppm de agua, y que retiene sustancialmente la actividad de perhidrólisis de al menos una enzima en dicha formulación.

Otro aspecto es para una formulación que comprende:

(1) una formulación secada por atomización que comprende:

a) al menos una enzima estructuralmente clasificada como una enzima CE-7 y que tiene actividad de perhidrólisis y un motivo identificativo que comprende:

50 (i) un motivo RGQ en los restos de aminoácidos 118-120

(ii) un motivo GXSQG en los restos de aminoácidos 179-183; y

(iii) un motivo HE en los restos de aminoácidos 298-299

cuando se alinea con la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1 usando un método de alineamiento de CLUSTAL W;

5 b) al menos un excipiente oligosacárido que tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1250 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 9000; y

c) opcionalmente al menos un tensioactivo; combinado con

(2) un éster de ácido carboxílico;

10 en donde dicha formulación comprende menos de 2000 ppm de agua, y en donde dicho al menos un excipiente oligosacárido estabiliza la actividad de perhidrólisis de dicha al menos una enzima en dicha formulación.

El éster de ácido carboxílico se puede seleccionar del grupo que consiste en monoacetina, diacetina, triacetina, monopropionina, dipropionina, tripropionina, monobutirina, dibutirina, tributirina, y sus mezclas.

15 Un aspecto adicional es para un procedimiento de producción de una formulación desinfectante o para el cuidado de la ropa que comprende el procedimiento definido antes, que comprende además la etapa combinar la formulación en la etapa (c) anterior con una disolución acuosa que comprende una fuente de peroxígeno.

Otro aspecto es para un procedimiento para producir un ácido peroxicarboxílico a partir de un éster de ácido carboxílico, que comprende

(a) proporcionar un conjunto de componentes de reacción, comprendiendo dichos componentes:

(1) una formulación descrita antes; y

20 (2) una fuente de peroxígeno; y

(b) combinar dichos componentes de reacción en condiciones de reacción acuosas adecuadas de modo que se produce un ácido peroxicarboxílico.

Un aspecto adicional es para un procedimiento para desinfectar una superficie dura u objeto inanimado, que comprende:

25 (a) proporcionar un conjunto de componentes de reacción, comprendiendo dichos componentes:

(1) una formulación descrita antes; y

(2) una fuente de peroxígeno;

(b) combinar dichos componentes de reacción en condiciones de reacción acuosas adecuadas de modo que se produce un ácido peroxicarboxílico; y

30 (c) diluir dicho producto de ácido peroxicarboxílico y poner en contacto dicha superficie dura u objeto inanimado con el ácido peroxicarboxílico diluido; o

(d) poner en contacto dicha superficie dura u objeto inanimado con el ácido peroxicarboxílico producido en la etapa (b).

35 Un aspecto adicional es para un procedimiento para decolorar, desodorizar, higienizar, desinfectar, blanquear o una de sus combinaciones, un artículo de ropa o producto textil, que comprende:

(a) proporcionar un conjunto de componentes de reacción, comprendiendo dichos componentes:

(1) una formulación descrita antes; y

(2) una fuente de peroxígeno;

40 (b) combinar dichos componentes de reacción en condiciones de reacción acuosas adecuadas de modo que se produce un ácido peroxicarboxílico;

(c) diluir dicho producto de ácido peroxicarboxílico y poner en contacto dicho artículo de ropa o producto textil con el ácido peroxicarboxílico diluido; o

(d) poner en contacto dicho artículo de ropa o producto textil con el ácido peroxicarboxílico producido en la etapa (b).

Breve descripción de las secuencias biológicas

- Las siguientes secuencias cumplen con la norma 37 C.F.R. §§ 1.821-1.825 ("Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules") y están de acuerdo con el estándar de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO) ST.25 (1998) y los requisitos de las listas de secuencias del Convenio sobre la Patente Europea (EPC) y las normas del Tratado de Cooperación en materia de patentes (PCT) 5.2 y 49.5(a-bis), y Sección 208 y Anexo C de las Instrucciones Administrativas. Los símbolos y el formato usados para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las normas expuestas en 37 C.F.R. § 1.822.
- 5 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos deducida de una cefalosporina C desacetilasa de *Bacillus subtilis* ATCC® 31954™.
- SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos deducida de una cefalosporina C desacetilasa de *B. subtilis* ATCC® 6633™.
- SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos deducida de una cefalosporina C desacetilasa de *B. licheniformis* ATCC® 14580™
- 15 SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos deducida de una acetil xilan esterasa de *B. pumilus* PS213.
- SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos deducida de una acetil xilan esterasa de *Clostridium thermocellum* ATCC® 27405™.
- SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos deducida de una acetil xilan esterasa de *Thermotoga neapolitana*.
- SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos deducida de una acetil xilan esterasa de *Thermotoga maritima* MSB8.
- 20 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos deducida de una acetil xilan esterasa de *Thermoanaerobacterium sp.* JW/SL YS485.
- SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos deducida de una cefalosporina C desacetilasa de *Bacillus sp.* NRRL B-14911. Debe indicarse que la secuencia de ácido nucleico que codifica la cefalosporina C desacetilasa de *Bacillus sp.* NRRL B-14911 como se da en GENBANK® con número de acceso ZP_01168674 parece codificar una adición N-terminal de 15 aminoácidos que es probable que sea incorrecta basado en los alineamientos de secuencias con otras cefalosporina C desacetilasas y en una comparación de la longitud dada (340 aminoácidos) frente a la longitud observada de otras enzimas CAH (típicamente de 318-325 aminoácidos de longitud; véase la solicitud de patente de EE.UU. copropiedad, copresentada y en tramitación junto con la presente, número de expediente del apoderado CL4205 US NA titulada "ENZYMATIC PERACID PRODUCTION USING A COSOLVENT"). Como tal, la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente memoria para la secuencia de la cefalosporina C desacetilasa de *Bacillus sp.* NRRL B-14911 no incluye los 15 aminoácidos N-terminales como se describen en el número de acceso de GENBANK® ZP_01168674.
- 25 SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos deducida de una cefalosporina C desacetilasa de *Bacillus halodurans* C-125.
- 30 SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos deducida de una cefalosporina C desacetilasa de *Bacillus clausii* KSM-K16.
- SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos deducida de una cefalosporina C desacetilasa (CAH) de *Bacillus subtilis* ATCC® 29233™.
- 40 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos deducida de una cefalosporina C desacetilasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.
- SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos deducida de una acetil xilan esterasa de *Thermotoga lettingae*.
- SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos deducida de una acetil xilan esterasa de *Thermotoga petrophila*.
- SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos deducida de una primera acetil xilan esterasa de *Thermotoga sp.* RQ2 descrita en la presente memoria como "RQ2(a)".
- 45 SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos deducida de una segunda acetil xilan esterasa de *Thermotoga sp.* RQ2 descrita en la presente memoria como "RQ2(b)".
- SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la región que abarca los restos de aminoácidos 118 a 299 de la SEQ ID NO: 1.

- SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos deducida de una variante de acetil xilan esterasa de *Thermotoga neapolitana* de la solicitud de patente de EE.UU. copropiedad, copresentada y en tramitación junto con la presente, número de expediente del apoderado CL4392 US NA, donde el resto Xaa en la posición 277 es Ala, Val, Ser o Thr.
- 5 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos deducida de una variante de acetil xilan esterasa de *Thermotoga maritima* MSB8 de la solicitud de patente de EE.UU. copropiedad, copresentada y en tramitación junto con la presente, número de expediente del apoderado CL4392 US NA, donde el resto Xaa en la posición 277 es Ala, Val, Ser o Thr.
- 10 SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos deducida de una variante de acetil xilan esterasa de *Thermotoga lettingae* de la solicitud de patente de EE.UU. copropiedad, copresentada y en tramitación junto con la presente, número de expediente del apoderado CL4392 US NA, donde el resto Xaa en la posición 277 es Ala, Val, Ser o Thr.
- SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos deducida de una variante de acetil xilan esterasa de *Thermotoga petrophila* de la solicitud de patente de EE.UU. copropiedad, copresentada y en tramitación junto con la presente, número de expediente del apoderado CL4392 US NA, donde el resto Xaa en la posición 277 es Ala, Val, Ser o Thr.
- 15 SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos deducida de una variante de acetil xilan esterasa de *Thermotoga* sp. RQ2, derivada de "RQ2(a)" de la solicitud de patente de EE.UU. copropiedad, copresentada y en tramitación junto con la presente, número de expediente del apoderado CL4392 US NA, donde el resto Xaa en la posición 277 es Ala, Val, Ser o Thr.
- 20 SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos deducida de una variante de acetil xilan esterasa de *Thermotoga* sp. RQ2, derivada de "RQ2(b)" de la solicitud de patente de EE.UU. copropiedad, copresentada y en tramitación junto con la presente, número de expediente del apoderado CL4392 US NA, donde el resto Xaa en la posición 278 es Ala, Val, Ser o Thr.
- SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos deducida de una acetil xilan esterasa de *Thermoanaerobacterium* sp. JW/SL YS485.
- 25 SEQ ID NO: 26 es la región codificante de un gen de resistencia a la kanamicina (*kan*) de *Streptomyces kanamyceticus*.
- SEQ ID NO: 27 es el plásmido pKD13, que contiene el gen de resistencia a la kanamicina.
- SEQ ID NO: 28 es un cebador directo usado para clonar *katG* a partir del plásmido pKD13.
- SEQ ID NO: 29 es un cebador inverso usado para clonar *katG* a partir del plásmido pKD13.
- 30 SEQ ID NO: 30 es el producto de la PCR de la amplificación de *katG* a partir del plásmido pKD13 usando los cebadores de SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29.
- SEQ ID NO: 31 es la región codificante del gen de la catalasa-peroxidasa (*katG*).
- SEQ ID NO: 32 es la secuencia de aminoácidos deducida de *katG*.
- SEQ ID NO: 33 es el plásmido pKD46, que contiene los genes de recombinasa λ -Red.
- SEQ ID NO: 34 es un cebador directo usado para confirmar la alteración de *katG*.
- 35 SEQ ID NO: 35 es un cebador inverso usado para confirmar la alteración de *katG*.
- SEQ ID NO: 36 es el plásmido pCP20 sensible a la temperatura, que contiene la recombinasa FLP.
- SEQ ID NO: 37 es un cebador directo usado para clonar *katE* a partir del plásmido pKD13.
- SEQ ID NO: 38 es un cebador inverso usado para clonar *katE* a partir del plásmido pKD13.
- 40 SEQ ID NO: 39 es el producto de la PCR de la amplificación de *katG* a partir del plásmido pKD13 usando los cebadores de SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38.
- SEQ ID NO: 40 es la región codificante del gen de la catalasa HP11 (*katE*).
- SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácidos deducida de *katE*.
- SEQ ID NO: 42 es un cebador directo usado para confirmar la alteración de *katE*.
- SEQ ID NO: 43 es un cebador inverso usado para confirmar la alteración de *katE*.

SEQ ID NO:44 es una región codificante de un gen que codifica la acetil xilan esterasa de *Thermotoga neapolitana* como se da en GENBANK® (nº de acceso AE000512).

SEQ ID NO: 45 es un cebador directo usado para amplificar el gen de la acetil xilan esterasa de *Thermotoga neapolitana*.

5 SEQ ID NO: 46 es un cebador inverso usado para amplificar el gen de la acetil xilan esterasa de *Thermotoga neapolitana*.

SEQ ID NO: 47 es el producto de la PCR de la amplificación de la acetil xilan esterasa usando los cebadores de SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46.

10 SEQ ID NO: 48 es un gen que codifica la acetil xilan esterasa de *Thermotoga maritima* MSB8 como se da en GENBANK® (nº de acceso NP_227893.1).

SEQ ID NO: 49 es un cebador directo usado para amplificar el gen de la acetil xilan esterasa de *Thermotoga maritima*.

SEQ ID NO: 50 es un cebador inverso usado para amplificar el gen de la acetil xilan esterasa de *Thermotoga maritima*.

15 SEQ ID NO: 51 es el producto de la PCR de la amplificación de la acetil xilan esterasa usando los cebadores de SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.

Descripción detallada de la invención

20 Se describen en la presente memoria polvos de enzimas que comprenden una formulación secada por atomización de al menos una carbohidrato esterasa CE-7 que tiene actividad de perhidrólisis, al menos un excipiente oligosacárido y opcionalmente al menos un tensioactivo. También se describe en la presente memoria un procedimiento para producir ácidos peroxicarboxílicos a partir de ésteres de ácidos carboxílicos usando los polvos de enzimas mencionados antes. Además, se describen formulaciones desinfectantes que comprenden los perácidos producidos por los procedimientos descritos en la presente memoria.

25 En esta descripción, se usa una serie de términos y abreviaturas. Se aplican las siguientes definiciones salvo que se exponga específicamente otra cosa.

30 Como se usa en la presente memoria, los artículos "un", "una" y "el", "la" que preceden un elemento o componente de la invención se pretende que no sean restrictivos en relación con el número de casos (es decir, apariciones) del elemento o componente. Por lo tanto, "un", "una" y "el", "la" deben leerse como que incluyen uno o al menos uno, y la forma singular del elemento o componente también incluyen el plural salvo que el número indique claramente que es singular.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "comprende" significa la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes expuestos como se cita en las reivindicaciones, pero que no excluye la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos. El término "comprende" se pretende que incluya las realizaciones abarcadas por las expresiones "consiste esencialmente en" y "consiste en". De forma similar, la expresión "consiste esencialmente en" se pretende que incluya realizaciones abarcadas por el término "consiste en".

40 Como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" modificando la cantidad de un ingrediente o reaccionante usado se refiere a la variación en la cantidad numérica que se puede producir, por ejemplo, por los procedimientos típicos de medición y manipulación de líquidos usados para hacer concentrados o usar disoluciones en el mundo real; por error accidental en estos procedimientos; por diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes usados para hacer las composiciones o llevar a cabo los métodos. El término "aproximadamente" también abarca cantidades que difieren debido a las diferentes condiciones de equilibrio para una composición que resulta de una mezcla inicial particular. Estén o no modificadas por el término "aproximadamente", las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades.

45 Cuando están presentes, todos los intervalos son inclusivos y combinables. Por ejemplo, cuando se cita un intervalo de "1 a 5", se debe considerar que el intervalo citado incluye intervalos de "1 a 4", "1 a 3", "1-2", "1-2 y 4-5", "1-3 y 5".

Como se usa en la presente memoria, los términos y expresiones "sustrato", "sustrato adecuado" y "sustrato de éster de ácido carboxílico" se refieren de forma indistinta específicamente a:

(a) uno o más ésteres que tienen la estructura

50 $[X]_mR_5$

en donde

X es un grupo éster de fórmula $R_6C(O)O$;

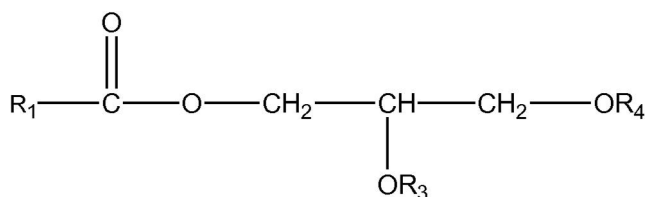
R_6 es un resto hidrocarbilo lineal, ramificado o cíclico, C1 a C7, opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo o grupo alcoxi C1 a C4, en donde R_6 opcionalmente comprende uno o más enlaces éter donde R_6 es de C2 a C7;

- 5 R_5 es un resto hidrocarbilo lineal, ramificado o cíclico, C1 a C6, opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, en donde cada átomo de carbono en R_5 comprende individualmente no más de un grupo hidroxilo o no más de un grupo éster y en donde R_5 opcionalmente comprende uno o más enlaces éter;

m es de 1 al número de átomos de carbono en R_5 ,

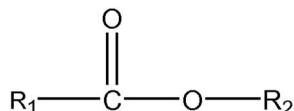
teniendo dichos uno o más ésteres una solubilidad en agua de al menos 5 ppm a 25°C; o

(b) uno o más glicéridos que tienen la estructura



- 10 en donde R_1 es un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada C1 a C7, opcionalmente sustituido con un hidroxilo o un grupo alcoxi C1 a C4 y R_3 y R_4 son individualmente H o $R_1C(O)$; o

(c) uno o más ésteres de fórmula



- 15 en donde R_1 es un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada C1 a C7, opcionalmente sustituido con un hidroxilo o un grupo alcoxi C1 a C4 y R_2 es un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada C1 a C10, alquenoilo, alquinoilo, arilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroarilo, $(CH_2CH_2O)_n$ o $(CH_2CH(CH_3)-O)_nH$ y n es de 1 a 10; o

(d) uno o más monosacáridos acetilados, disacáridos acetilados o polisacáridos acetilados; o

(e) cualquier combinación de (a) a (d).

- 20 Los ejemplos de dicho sustrato éster de ácido carboxílico pueden incluir monoacetina; triacetina; monopropionina; dipropionina; tripropionina; monobutirina; dibutirina; tributirina; pentaacetato de glucosa; tetraacetato de xilosa; xilano acetilado; fragmentos de xilano acetilado; β -D-ribofuranosa-1,2,3,5-tetraacetato; tri-O-acetil-D-galactal; tri-O-acetilglucal; diacetato de propilenglicol; diacetato de etilenglicol; monoésteres o diésteres de 1,2-etanodiol; 1,2-propanodiol; 1,3-propanodiol; 1,2-butanodiol; 1,3-butanodiol; 2,3-butanodiol; 1,4-butanodiol; 1,2-pentanodiol; 2,5-pentanodiol; 1,6-pentanodiol, 1,2-hexanodiol; 2,5-hexanodiol; 1,6-hexanodiol o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en la presente memoria, el término "perácido" es sinónimo de peroxiácido, ácido peroxicarboxílico, ácido peroxi, ácido percarboxílico y ácido peroxoico.

- 30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "ácido peracético" se abrevia "PAA" y es sinónimo de ácido peroxiacético, ácido etanoperoxoico y todos los demás sinónimos del número de registro CAS 79-21-0.

Como se usa en la presente memoria, el término "monoacetina" es sinónimo de monoacetato de glicerol, monoacetato de glicerina y monoacetato de glicerilo.

Como se usa en la presente memoria, el término "diacetina" es sinónimo de diacetato de glicerol; diacetato de glicerina, diacetato de glicerilo y todos los demás sinónimos de número de registro CAS 25395-31-7.

- 35 Como se usa en la presente memoria, el término "triacetina" es sinónimo de triacetato de glicerina; triacetato de glicerol; triacetato de glicerilo, 1,2,3-triacetoxipropano; triacetato de 1,2,3-propanetriol y todos los demás sinónimos de número de registro CAS 102-76-1.

Como se usa en la presente memoria, el término "monobutirina" es sinónimo de monobutirato de glicerol, monobutirato de glicerina y monobutirato de glicerilo.

- 40 Como se usa en la presente memoria, el término "dibutirina" es sinónimo de dibutirato de glicerol y dibutirato de glicerilo.

Como se usa en la presente memoria, el término "tributirina" es sinónimo de tributirato de glicerol, 1,2,3-tributirilglicerol, y todos los demás sinónimos de número de registro CAS 60-01-5.

Como se usa en la presente memoria, el término "monopropionina" es sinónimo de monopropionato de glicerol, monopropionato de glicerina y monopropionato de glicerilo.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término "dipropionina" es sinónimo de dipropionato de glicerol y dipropionato de glicerilo.

Como se usa en la presente memoria, el término "tripropionina" es sinónimo de tripropionato de glicerilo, tripropionato de glicerol, 1,2,3-tripropionilglicerol, y todos los demás sinónimos de número de registro CAS 139-45-7.

- 10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "acetato de etilo" es sinónima de éter acético, acetoxietano, etanoato de etilo, éster etílico del ácido acético, éster etílico del ácido etanoico, éster etílico acético y todos los demás sinónimos de número de registro CAS 141-78-6.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "lactato de etilo" es sinónima de éster etílico del ácido láctico y todos los demás sinónimos de número de registro CAS 97-64-3.

- 15 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "azúcar acetilado" y "sacárido acetilato" se refieren a mono, di y polisacáridos que comprenden al menos un grupo acetilo. Los ejemplos incluyen pentaacetato de glucosa, tetraacetato de xilosa, xilano acetilado, fragmentos de xilano acetilado, β -D-ribofuranosa-1,2,3,5-tetraacetato, tri-O-acetil-D-galactal y tri-O-acetil-glucal

- 20 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "hidrocarbilo", "grupo hidrocarbilo" y "resto hidrocarbilo" significan una disposición de cadena lineal, ramificada o cíclica de átomos de carbono conectados por enlaces carbono-carbono sencillos, dobles o triples y/o por uniones éter, y sustituidos en consecuencia con átomos de hidrógeno. Dichos grupos hidrocarbilo pueden ser alifáticos y/o aromáticos. Los ejemplos de grupos hidrocarbilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, ciclopropilo, ciclobutilo, pentilo, ciclopentilo, metilciclopentilo, hexilo, ciclohexilo, bencilo y fenilo. En una realización preferida, el resto hidrocarbilo es una disposición de cadena lineal, ramificada o cíclica de átomos de carbono conectados por enlaces carbono-carbono sencillos y/o por uniones éter, y sustituidos en consecuencia con átomos de hidrógeno.

- 25 Como se usa en la presente memoria, los términos "monoésteres" y "diésteres" de 1,2-etanodiol; 1,2-propanodiol; 1,3-propanodiol; 1,2-butanodiol; 1,3-butanodiol; 2,3-butanodiol; 1,4-butanodiol; 1,2-pentanodiol; 2,5-pentanodiol; 1,6-pentanodiol; 1,2-hexanodiol; 2,5-hexanodiol; 1,6-hexanodiol; y sus mezclas, se refiere a dichos compuestos que comprenden al menos un grupo éster de fórmula RC(O)O, en donde R es un resto hidrocarbilo lineal C1 a C7. En una realización, el sustrato de éster de ácido carboxílico se selecciona del grupo que consiste en diacetato de propilenglicol (PGDA), diacetato de etilenglicol (EDGA), y sus mezclas.

- 30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "diacetato de propilenglicol" es sinónima de 1,2-diacetoxipropano, diacetato de propileno, diacetato de 1,2-propanodiol, y todos los demás sinónimos de número de registro CAS 623-84-7.

- 35 Como se usa en la presente memoria, la expresión "diacetato de etilenglicol" es sinónima de 1,2-diacetoxietano, diacetato de etileno, diacetato de glicol, y todos los demás sinónimos de número de registro CAS 111-55-7.

- 40 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "mezcla de reacción enzimática adecuada", "componentes adecuados para la generación in situ de un perácido", "componentes de reacción adecuados" y "mezcla de reacción acuosa adecuada" se refiere a los materiales y agua en los que los reaccionantes y el catalizador enzimático se ponen en contacto. Se proporcionan en la presente memoria los componentes de la mezcla de reacción acuosa adecuados y los expertos en la técnica apreciarán la variedad de variaciones de componentes adecuados para este procedimiento. La mezcla de reacción enzimática adecuada puede producir perácido in situ tras la combinación de los componentes de reacción. Como tal, los componentes de reacción se pueden proporcionar como un sistema multicomponentes en donde uno o más de los componentes de reacción permanecen separados hasta su uso. Los componentes de la reacción se pueden combinar primero para formar una disolución acuosa de perácido que posteriormente se pone en contacto con la superficie que se va a desinfectar y/o blanquear. El diseño de sistemas y medios para separar y combinar múltiples componentes activos es conocido en la técnica y en general dependerá de la forma física de los componentes de reacción individuales. Por ejemplo, los sistemas de fluidos activos múltiples (líquido-líquido) típicamente usan botellas dispensadoras de múltiples cámaras o sistemas de dos fases (p. ej., publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2005/0139608; patente de EE.UU. 5.398.846; patente de EE.UU. 5.624.634; patente de EE.UU. 6.391.840; patente E.P. 0807156B1; publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2005/0008526; y publicación PCT N° WO 00/61713) tal como se encuentra en algunas aplicaciones blanqueadoras en donde el agente blanqueador deseado se produce tras la mezcla de los fluidos reactivos. Otras formas de sistemas multicomponentes usados para generar perácido pueden incluir los diseñados para uno o más componentes sólidos o combinaciones de componentes sólido-líquido, tales como polvos (p. ej., patente de EE.UU. 5.116.575), comprimidos multicapas (p. ej., patente de EE.UU. 6.210.639), paquetes que se pueden disolver en agua que tienen múltiples componentes (p. ej., patente de EE.UU. 6.995.125) y aglomerados sólidos que reaccionan

tras la adición de agua (p. ej., patente de EE.UU. 6.319.888). Una formulación multicomponentes se puede proporcionar como dos componentes individuales de modo que se genera una disolución acuosa que comprende un ácido peroxicarboxílico tras combinar los dos componentes. Por lo tanto, también se describe en la presente memoria una formulación multicomponente que comprende:

5 a) un primer componente que comprende:

i) un polvo de enzima como se describe en la presente memoria; y

ii) un éster de ácido carboxílico, comprendiendo opcionalmente dicho primer componente un ingrediente adicional seleccionado del grupo que consiste en un tampón inorgánico u orgánico, un inhibidor de la corrosión, un agente humectante, y sus combinaciones; y

10 b) un segundo componente que comprende una fuente de peróxígeno y agua, comprendiendo opcionalmente dicho segundo componente un estabilizante de peróxido de hidrógeno.

El éster de ácido carboxílico en el primer componente se puede seleccionar del grupo que consiste en monoacetina, diacetina, triacetina y sus combinaciones. El éster de ácido carboxílico en el primer componente puede ser un sacárido acetilado. El catalizador enzimático en el primer componente puede ser un sólido en partículas. El primer
15 componente de reacción puede ser un comprimido sólido o polvo.

Como se usa en la presente memoria, el término "perhidrólisis" se define como la reacción de un sustrato seleccionado con peróxido para formar un perácido. Típicamente, el peróxido inorgánico se hace reaccionar con el sustrato seleccionado en presencia de un catalizador para producir el perácido. Como se usa en la presente memoria, la expresión "perhidrólisis química" incluye reacciones de perhidrólisis en las que un sustrato (un precursor de perácido) se combina con una fuente de peróxido de hidrógeno, en donde el perácido se forma en ausencia de un catalizador enzimático.
20

Como se usa en la presente memoria, la expresión "actividad de perhidrolasa" se refiere a la actividad de catalizador por unidad de masa (por ejemplo, miligramo) de proteína, peso de células seco, o peso de catalizador inmovilizado.

Como se usa en la presente memoria, "una unidad de actividad enzimática" o "una unidad de actividad" o "U" se define como la cantidad de actividad de perhidrolasa necesaria para la producción de 1 μ mol de producto perácido por minuto a una temperatura especificada.
25

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "catalizador enzimático" y "catalizador perhidrolasa" se refieren a un catalizador que comprende una enzima que tiene actividad de perhidrólisis y puede estar en forma de una célula microbiana entera, célula o células microbianas permeabilizadas, uno o más componentes celulares de un extracto celular microbiano, enzima parcialmente purificada o enzima purificada. El catalizador enzimático también se puede modificar químicamente (p. ej., por pegilación o por reacción con reactivos de reticulación). El catalizador de perhidrolasa también se puede inmovilizar sobre un soporte soluble o insoluble usando métodos bien conocidos para los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, *Immobilization of Enzymes and Cells*; Gordon F. Bickerstaff, Editor; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 1997. Como se describe en la presente memoria, todas las enzimas presentes que tienen actividad de perhidrólisis estructuralmente son miembros de la familia de carbohidrato esterasas familia 7 (familia CE-7) de enzimas (véase, Coutinho, P.M., Henrissat, B. "Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach" en *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat y B. Svensson eds., (1999) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pág. 3-12.). La familia CE-7 de enzimas se ha demostrado que es particularmente eficaz para producir perácidos a partir de una variedad de sustratos éster de ácido carboxílico cuando se combinan con una fuente de peróxígeno (véase, la publicación PCR N° WO2007/070609 y publicaciones de solicitudes de patentes de EE.UU. N° 2008/0176299, 2008/176783, y 2009/0005590 de DiCosimo et al.).
30
35
40

Los miembros de la familia CE-7 incluyen cefalosporina C desacetilasas (CAH; E.C. 3.1.1.41) y acetil xilan esterasas (AXE; E.C. 3.1.1.72). Los miembros de la familia de esterasas CE-7 comparten un motivo identificativo conservado (Vincent et al., *J. Mol. Biol.*, 330:593-606 (2003)). Las perhidrolasas que comprenden el motivo identificativo CE-7 son adecuadas para usar en la presente invención. Los medios para identificar moléculas biológicas sustancialmente similares son bien conocidas en la técnica (p. ej., protocolos de alineamiento de secuencias, hibridaciones de ácidos nucleicos y/o la presencia de un motivo identificativo conservado). En un aspecto, las presentes perhidrolasas incluyen enzimas que comprenden el motivo identificativo de CE-7 y al menos 30%, preferiblemente al menos 33%, más preferiblemente al menos 40%, incluso más preferiblemente al menos 42%, incluso más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, incluso más preferiblemente al menos 70%, incluso más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de aminoácidos con las secuencias proporcionadas en la presente memoria. En un aspecto adicional, las presentes perhidrolasas incluyen enzimas que comprenden el motivo identificativo de CE-7 y al menos 30%, preferiblemente al menos 33%, más preferiblemente al menos 40%, incluso más preferiblemente al menos 42%, incluso más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, incluso más preferiblemente al menos 70%, incluso más preferiblemente al menos 80%, incluso más
45
50
55

preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "polvo de enzima" se refiere al producto secado por atomización de una formulación acuosa que comprende (1) al menos una enzima estructuralmente clasificada como un carbohidrato esterasa CE-7 que tiene actividad de perhidrólisis, (2) al menos un excipiente oligosacárido que tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1250 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 9000, y opcionalmente al menos un tensioactivo. En una realización, la formulación acuosa comprende además al menos un tampón.

10 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "cefalosporina C desacetilasa" y "cefalosporina C acetil hidrolasa" se refieren a una enzima (E.C. 3.1.1.41) que cataliza la desacetilación de cefalosporinas tales como la cefalosporina C y el ácido 7-aminocefalosporánico (Mitsushima et al., (1995) *Appl. Env. Microbiol.* 61(6):2224-2229). Se proporcionan varias cefalosporina C desacetilasas en la presente memoria que tienen actividad de perhidrólisis significativa.

15 Como se usa en la presente memoria, las "acetil xilan esterases" se refieren a una enzima (E.C. 3.1.1.72; AXE) que cataliza la desacetilación de xilanos acetilados y otros sacáridos acetilados. Como se ilustra en la presente memoria, se proporcionan varias enzimas clasificadas como acetil xilan esterases que tienen actividad de perhidrólisis significativa.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión *Bacillus subtilis* ATCC® 31954™ se refiere a una célula bacteriana depositada en la American Type Culture Collection (ATCC®) que tiene un número de acceso de depositario internacional ATCC® 31954™. Se ha descrito que *Bacillus subtilis* ATCC® 31954™ tiene una actividad de éster hidrolasa ("diacetinasa") capaz de hidrolizar ésteres de glicerol que tienen grupos acilo de 2 a 8 átomos de carbono, en especial diacetina (patente de EE.UU. 4.444.886). Como se describe en la presente memoria, se ha aislado una enzima que tiene actividad de perhidrolasa significativa de *B. subtilis* ATCC® 31954™ y se proporciona como la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de la enzima aislada tiene 100% de identidad de aminoácidos con la cefalosporina C desacetilasa proporcionada por el nº de acceso en GENBANK® BAA01729.1 (Mitsushima et al., véase antes).

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Bacillus subtilis* ATCC® 29233™" se refiere a una cepa de *Bacillus subtilis* depositada en la American Type Culture Collection (ATCC®) que tiene un número de acceso de depositario internacional ATCC® 29233™. Como se describe en la presente memoria, se ha aislado y secuenciado una enzima que tiene actividad de perhidrolasa significativa de *B. subtilis* ATCC® 29233™ y se proporciona como la SEQ ID NO: 12.

35 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Clostridium thermocellum* ATCC® 27405™" se refiere a una cepa de *Clostridium thermocellum* depositada en la American Type Culture Collection (ATCC®) que tiene un número de acceso de depositario internacional ATCC® 27405™. La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *C. thermocellum* ATCC® 27405™ se proporciona como la SEQ ID NO: 5.

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Bacillus subtilis* ATCC® 6633™" se refiere a una célula bacteriana depositada en la American Type Culture Collection (ATCC®) que tiene un número de acceso de depositario internacional ATCC® 6633™. Se ha descrito que *Bacillus subtilis* ATCC® 6633™ tiene actividad de cefalosporina acetilhidrolasa (patente de EE.UU. 6.465.233). La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *B. subtilis* ATCC® 6633™ se proporciona como SEQ ID NO: 2.

45 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Bacillus licheniformis* ATCC® 14580™" se refiere a una célula bacteriana depositada en la American Type Culture Collection (ATCC®) que tiene un número de acceso de depositario internacional ATCC® 14580™. Se ha descrito que *Bacillus licheniformis* ATCC® 14580™ tiene actividad de cefalosporina acetilhidrolasa. La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *B. licheniformis* ATCC® 14580™ se proporciona como SEQ ID NO: 3.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Bacillus pumilus* PS213" se refiere a una célula bacteriana que se ha descrito que tiene actividad de acetil xilan esterasa (GENBANK® AJ249957). La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *Bacillus pumilus* PS213 se proporciona como SEQ ID NO: 4.

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Thermotoga neapolitana*" se refiere a una cepa de *Thermotoga neapolitana* que se ha descrito que tiene actividad de acetil xilan esterasa (GENBANK® AAB70869). La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *Thermotoga neapolitana* se proporciona como SEQ ID NO: 6.

55 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Thermotoga maritima* MSB8" se refiere a una célula bacteriana que se ha descrito que tiene actividad de acetil xilan esterasa (GENBANK® NP_227893.1). La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *Thermotoga maritima* MSB8 se proporciona como SEQ ID NO: 7.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Bacillus clausii* KSM-K16" se refiere a una célula bacteriana que se ha descrito que tiene actividad de cefalosporina C desacetilasa (GENBANK® YP_175265). La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *Bacillus clausii* KSM-K16 se proporciona como SEQ ID NO: 11.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*" se refiere a una célula bacteriana que se ha descrito que tiene actividad de acetil xilan esterasa (GENBANK® S41858). La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* se proporciona como SEQ ID NO: 13.

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Thermotoga lettingae*" se refiere a una célula bacteriana que se ha descrito que tiene actividad de acetil xilan esterasa (GENBANK® CP000812). La secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *Thermotoga lettingae* se proporciona como SEQ ID NO: 14.

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*Thermotoga petrophila*" se refiere a una célula bacteriana que se ha descrito que tiene actividad de acetil xilan esterasa (GENBANK® CP000702). La secuencia de aminoácidos deducida de la enzima que tiene actividad de perhidrolasa de *Thermotoga lettingae* se proporciona como SEQ ID NO: 15.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*TThermotoga* sp. RQ2" se refiere a una célula bacteriana que se ha descrito que tiene actividad de acetil xilan esterasa (GENBANK® CP000969). Se han identificado dos acetil xilan estererasas diferentes de *Thermotoga* sp. RQ2 y se denominan en la presente memoria "RQ2(a)" (la secuencia de aminoácidos deducida proporcionada como SEQ ID NO: 16) y "RQ2(b)" (la secuencia de aminoácidos deducida proporcionada como SEQ ID NO: 17).

25 Como se usa en la presente memoria, una "molécula de ácido nucleico aislada" y "fragmento de ácido nucleico aislado" se usarán de forma indistinta y se refieren a un polímero de ARN o ADN que es monocatenario o bicatenario, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Una molécula de ácido nucleico aislada en forma de un polímero de ADN puede estar compuesta de uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

El término "aminoácido" se refiere a la unidad estructural química básica de una proteína o polipéptido. Las siguientes abreviaturas se usan en la presente memoria para identificar los aminoácidos específicos:

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier aminoácido o como se define en la presente memoria	Xaa	X

Como se usa en la presente memoria, "sustancialmente similar" se refiere a moléculas de ácido nucleico en donde cambios en una o más bases de nucleótidos dan como resultado la adición, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos, pero no afectan a las propiedades funcionales (es decir, actividad perhidrolítica) de la proteína codificada por la secuencia de ADN. Como se usa en la presente memoria, "sustancialmente similar" también se refiere a una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 30%, preferiblemente al menos 33%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, incluso más preferiblemente al menos 70%, incluso más preferiblemente al menos 80%, incluso todavía más preferiblemente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias descritas en la presente memoria, en donde la enzima resultante retiene las presentes propiedades funcionales (es decir, actividad perhidrolítica). "Sustancialmente similar" también se puede referir a una enzima que tiene actividad perhidrolítica codificada por moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones rigurosas con las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. Por lo tanto, se entiende que la invención abarca más que las secuencias de ejemplo específicas.

Por ejemplo, es bien conocido en la técnica que son comunes las alteraciones en un gen que dan como resultado la producción de un aminoácido químicamente equivalente en un sitio dado, pero no afectan a las propiedades funcionales de la proteína codificada. Para los fines de la presente invención, las sustituciones se definen como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes:

1. Restos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2. Restos polares, con carga negativa, y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Restos polares, con carga positiva: His, Arg, Lys;
4. Restos no polares, alifáticos largos; Met, Leu, Ile, Val (Cys); y
5. Restos aromáticos largos: Phe, Tyr y Trp.

Por lo tanto, un codón para el aminoácido alanina, un aminoácido hidrófobo, se puede sustituir por un codón que codifica otro resto menos hidrófobo (tal como glicina) o un resto más hidrófobo (tal como valina, leucina o isoleucina). De forma similar, también se puede esperar que cambios que dan como resultado la sustitución de un resto con carga negativa por otro (tal como ácido aspártico por ácido glutámico) o un resto con carga positiva por otro (tal como lisina por arginina) produzcan un producto funcionalmente equivalente. En muchos casos, tampoco se esperaría que cambios de nucleótidos que dan como resultado la alteración de las partes N-terminal y C-terminal de la molécula de proteína, alteraran la actividad de la proteína.

Cada una de las modificaciones propuestas está dentro de la rutina del experto en la técnica, así como lo está la determinación de la retención de la actividad biológica de los productos codificados. Además, el experto en la técnica reconoce que secuencias sustancialmente similares están englobadas por la presente invención. En una realización, las secuencias sustancialmente similares se definen por su capacidad para hibridar, en condiciones rigurosas (0,1X SSC, SDS al 0,1% , 65°C y lavado con 2X SSC, SDS al 0,1% seguido de 0,1X SSC, SDS al 0,1%, 65°C) con las secuencias ilustradas en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico es "hibrizable" con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una sola cadena de la primera molécula se puede asociar con la otra molécula en condiciones adecuadas de temperatura y fuerza iónica de la disolución. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas y se ilustran en Sambrook, J. y Russell, D., T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. Las condiciones de rigurosidad se pueden ajustar para cribar moléculas moderadamente similares, tales como secuencias homólogas de organismos lejanamente relacionados, para moléculas muy similares, tales como genes que duplican las enzimas funcionales de organismos estrechamente relacionados. Los lavados posthibridación típicamente determinan las condiciones de rigurosidad. Un conjunto de condiciones preferidas usa una serie de lavados que comienzan con 6X SSC, SDS al 0,5% a temperatura ambiente durante 15 min, después se repite con 2X SSC, SDS al 0,5% a 45°C durante 30 min, y después se repite dos veces con 0,2X SSC, SDS al 0,5% a 50°C durante 30 min. Un conjunto más preferido de condiciones usa temperaturas mayores en las que los lavados son idénticos a los anteriores excepto que la temperatura de los dos lavados finales de 30 min en 0,2X SSC, SDS al 0,5% se aumentó a 60°C. Otro conjunto preferido de condiciones de hibridación rigurosas es 0,1 X SSC, SDS al 0,1%, 65°C y lavado con 2X SSC, SDS al 0,1% seguido de un lavado final de 0,1X SSC, SDS al 0,1%, 65°C con las secuencias ilustradas en la presente memoria. En una realización adicional, las presentes composiciones y métodos usan una enzima que tiene actividad de perhidrolasa codificada por una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de perhidrólisis, teniendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID

NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25.

La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles apareamientos erróneos entre bases. La rigurosidad adecuada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y el grado de complementariedad, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor es el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor es el valor de T_m para los híbridos de ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (que corresponde a mayor T_m) de las hibridaciones de ácido nucleico disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para los híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido las ecuaciones para calcular T_m (Sambrook y Russell, véase antes). Para hibridaciones con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los apareamientos erróneos se hace más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (Sambrook y Russell, véase antes). En un aspecto, la longitud para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos. Preferiblemente, una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, más preferiblemente al menos 20 nucleótidos de longitud, incluso más preferiblemente al menos 30 nucleótidos de longitud, incluso más preferiblemente al menos 300 nucleótidos de longitud y lo más preferiblemente al menos 800 nucleótidos de longitud. Además, el experto en la técnica reconocerá que la temperatura y la concentración salina de la disolución de lavado se pueden ajustar según sea necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la sonda.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "porcentaje de identidad" es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada por comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación entre las secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según el caso, determinada por el emparejamiento entre cadenas de dichas secuencias. La "identidad" y "similitud" se pueden calcular fácilmente por métodos conocidos tales como los métodos descritos en: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1993); Computer Analysis of Sequence Data. Part I (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); y Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.) Stockton Press, NY (1991). Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Los alineamientos de secuencias y los cálculos de porcentaje de identidad se pueden llevar a cabo usando el programa Megalign del paquete de programas bioinformáticos LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI), el programa AlignX de Vector NTI v. 7.0 (Informax, Inc., Bethesda, MD), o el paquete de programas EMBOSS Open Software Suite (EMBL-EBI; Rice et al., *Trends in Genetics* 16, (6):276-277 (2000)). Se pueden realizar alineamientos múltiples de las secuencias usando el método Clustal (p. ej., CLUSTALW; por ejemplo la versión 1.83) de alineamiento (Higgins y Sharp, *CABIOS*, 5:151-153 (1989); Higgins et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994); y Chenna et al., *Nucleic Acids Res* 31 (13):3497-500 (2003)), disponible en European Molecular Biology Laboratory a través del European Bioinformatics Institute) con los parámetros por defecto. Los parámetros adecuados para los alineamientos de proteínas en CLUSTALW incluyen la penalización por existencia de hueco (GAP) =15, extensión de hueco =0,2, matriz = Gonnet (p. ej. Gonnet250), Terminación de hueco de proteína (ENDGAP) = -1, Distancia de hueco de proteína (GAPDIST)=4, y KTUPLE=1. En una realización, se usa un alineamiento rápido o lento con los parámetros por defecto, donde se prefiere un alineamiento lento. Alternativamente, los parámetros usando el método CLUSTALW (versión 1.83) se pueden modificar para usar también KTUPLE =1, Penalización por hueco =10, Extensión de hueco =1, matriz = BLOSUM (p. ej. BLOSUM64), Ventana (WINDOW)=5, y Diagonales superiores guardadas (TOP DIAGONALS SAVED)=5.

En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico aisladas adecuadas codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 30%, preferiblemente al menos 33%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 85%, incluso más preferiblemente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria. Las moléculas de ácido nucleico adecuadas no solo tienen las homologías anteriores, si no que típicamente también codifican un polipéptido que tiene de aproximadamente 300 a aproximadamente 340 aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 310 a aproximadamente 330 aminoácidos, y lo más preferiblemente aproximadamente 318 aminoácidos.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "motivo identificativo", "motivo identificativo de CE-7" y "motivo de diagnóstico" se refieren a estructuras conservadas compartidas entre una familia de enzimas que tienen una actividad definida. El motivo identificativo se puede usar para definir y/o identificar la familia de enzimas estructuralmente relacionadas que tienen actividad enzimática similar para una familia definida de sustratos. El motivo identificativo puede ser una única secuencia de aminoácidos contiguos o una colección de motivos conservados, no contiguos que juntos forman el motivo identificativo. Típicamente, el(los) motivo(s) conservado(s) está(n) representado(s) por una secuencia de aminoácidos. Como se describe en la presente memoria, las presentes enzimas que tienen actividad de perhidrólisis ("perhidrolasas") pertenecen a la familia de carbohidrato esterasas CE-7 (DiCosimo et al., véase antes). Como se usa en la presente memoria, la frase la "enzima se clasifica estructuralmente como una enzima CE-7" o "perhidrolasa CE-7" se usará para referirse a enzimas que tienen actividad de perhidrólisis que se clasifican estructuralmente como una carbohidrato esterasa CE-7. Esta familia de

enzimas se puede definir por la presencia de un motivo identificativo (Vincent et al., véase antes). Como se define en la presente memoria, el motivo identificativo para las esterasas CE-7 comprende tres motivos conservados (numeración de posiciones de los restos con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1):

a) Arg118-Gly119-Gln120;

5 b) Gly179-Xaa180-**Ser181**-Gln182-Gly183; y

c) **His298**-Glu299.

10 Típicamente el Xaa en la posición de resto de aminoácido 180 es glicina, alanina, prolina, triptófano o treonina. Dos de los tres restos de aminoácidos que pertenecen a la triada catalítica están en negrilla. En una realización, el Xaa en la posición de resto de aminoácido 180 se selecciona del grupo que consiste en glicina, alanina, prolina, triptófano y treonina.

El análisis adicional de los motivos conservados dentro de la familia de carbohidrato esterasas CE-7 indica la presencia de un motivo conservado adicional (LXD en las posiciones de aminoácidos 267-269 de la SEQ ID NO: 1) que se puede usar para definir más una perhidrolasa que pertenece a la familia de carbohidrato esterasas CE-7. En una realización adicional, el motivo identificativo definido antes incluye un cuarto motivo conservado definido como:

15 Leu267 -Xaa268-**Asp269**.

El Xaa en la posición de resto de aminoácido 268 típicamente es isoleucina, valina o metionina. El cuarto motivo incluye el resto de ácido aspártico (negrilla) que pertenece a la triada catalítica (Ser181-Asp269-His298).

20 Se puede usar una serie de algoritmos de alineamiento globales bien conocidos para alinear dos o más secuencias de aminoácidos que representan enzimas que tienen actividad de perhidrolasa para determinar si la enzima comprende el presente motivo identificativo. La(s) secuencia(s) alineada(s) se comparan con la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 1) para determinar la existencia del motivo identificativo. En una realización, se usa un alineamiento de CLUSTAL (tal como CLUSTALW) que usa una secuencia de aminoácidos de referencia (como se usa en la presente memoria la secuencia de perhidrolasa (SEQ ID NO: 1) de *Bacillus subtilis* ATCC® 31954™) para identificar perhidrolasas que pertenecen a la familia de esterasas CE-7. La numeración relativa de los restos de aminoácidos conservados se basa en la numeración de restos de la secuencia de aminoácidos de referencia para explicar pequeñas inserciones o eliminaciones (por ejemplo, cinco aminoácidos o menos) dentro de la secuencia alineada.

30 Los ejemplos de otros algoritmos adecuados que se pueden usar para identificar secuencias que comprenden el presente motivo identificativo (cuando se comparan con la secuencia de referencia) incluyen Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48, 443-453 (1970); una herramienta de alineamiento global) y Smith-Waterman (*J. Mol. Biol.* 147:195-197 (1981); una herramienta de alineamiento local). En una realización, se implementa un alineamiento de Smith-Waterman usando los parámetros por defecto. Un ejemplo de los parámetros por defecto adecuados incluye el uso de una matriz de puntuación BLOSUM62 con penalización por hueco abierto = 10 y una penalización por extensión de hueco = 0,5.

35 Una comparación del porcentaje de identidad general entre perhidrolasas ilustradas en la presente memoria indica que enzimas que tienen tan poco como 33% de identidad con la SEQ ID NO: 1 (a la vez que retienen el motivo identificativo) presentan actividad de perhidrolasa significativa y se clasifican estructuralmente como carbohidrato esterasas CE-7. En una realización, las perhidrolasas adecuadas incluyen enzimas que comprenden el motivo identificativo de CE-7 y al menos 30%, preferiblemente al menos 33%, más preferiblemente al menos 40%, incluso más preferiblemente al menos 42%, incluso más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, incluso más preferiblemente al menos 70%, incluso más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1.

45 Alternativamente, también se puede usar una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende la región que abarca los motivos conservados para identificar miembros de la familia CE-7.

50 Como se usa en la presente memoria, la "degeneración de codones" se refiere a la naturaleza del código genético que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin afectar a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. Por consiguiente, se describe en la presente memoria cualquier molécula de ácido nucleico que codifique todo o una parte sustancial de las secuencias de aminoácidos que codifican el presente polipéptido microbiano. El experto en la técnica es muy consciente del "sesgo de codones" presentado por una célula hospedante específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, cuando se sintetiza un gen para mejorar la expresión en una célula hospedante, es deseable diseñar el gen de modo que su frecuencia de uso de codones se aproxime a la frecuencia de uso de codones preferidos de la célula hospedante.

55 Como se usa en la presente memoria, la expresión "codones optimizados", se refiere a genes o regiones codificantes de moléculas de ácido nucleico para la transformación de diferentes hospedantes, se refiere a la

alteración de codones en el gen o regiones codificantes de las moléculas de ácido nucleico para reflejar el uso de codones típico del organismo hospedante sin alterar el polipéptido que codifica el ADN.

5 Como se usa en la presente memoria, los "genes sintéticos" se pueden ensamblar a partir de unidades estructurales de oligonucleótidos que se sintetizan químicamente usando procedimientos conocidos para el experto en la técnica. Estas unidades estructurales se ligan y asocian para formar segmentos de genes que después son ensamblados enzimáticamente para construir el gen entero. "Químicamente sintetizado", como perteneciente a una secuencia de ADN, significa que los nucleótidos componentes son ensamblados in vitro. La síntesis química manual del ADN se puede llevar a cabo usando procedimientos bien consolidados, o síntesis química automática usando una de una serie de máquinas disponibles en el mercado. Por consiguiente, los genes se pueden diseñar para la expresión génica óptima basándose en la optimización de secuencias de nucleótidos para reflejar el sesgo de codones de la célula hospedante. El experto en la técnica aprecia la probabilidad de expresión génica satisfactoria si el uso de codones se desvía hacia aquellos codones favorecidos por el hospedante. La determinación de codones preferidos se puede basar en un estudio de genes derivados de la célula hospedante donde está disponible información de secuencia.

15 Como se usa en la presente memoria, "gen" se refiere a una molécula de ácido nucleico que expresa una proteína específica, que incluye secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificantes) y que siguen (secuencias 3' no codificantes) a la secuencia codificante. "Gen natural" se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen natural, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de la misma fuente, pero dispuestas de una forma diferente a la encontrada en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen natural en su ubicación natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo hospedante, pero que se introduce en el organismo hospedante mediante una transferencia de genes. Los genes extraños pueden comprender genes naturales insertados en un organismo no natural, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

30 Como se usa en la presente memoria, "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. "Secuencias reguladoras adecuadas" se refiere a secuencias de nucleótidos situadas en la dirección 5' (secuencias 5' no codificantes), dentro o en la dirección 3' (secuencias 3' no codificantes) de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento de ARN o estabilidad, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, sitio de procesamiento de ARN, sitio de unión de efectores y estructura de tallo-bucle.

35 Como se usa en la presente memoria, "promotor" se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante se sitúa 3' respecto a una secuencia de promotor. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen natural, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes etapas del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que hacen que un gen sea expresado la mayoría de las veces se denominan normalmente "promotores constitutivos". Se reconoce además que puesto que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener idéntica actividad de promotor.

45 Como se usa en la presente memoria, las "secuencias 3' no codificantes" se refieren a secuencias de ADN situadas en la dirección 3' de una secuencia codificante e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación (normalmente limitadas a eucariotas) y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o expresión de genes. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tramos de poli(ácido adenílico) (normalmente limitado a eucariotas) al extremo 3' del precursor de ARNm.

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "operativamente unido" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en una sola molécula de ácido nucleico de modo que la función de una está afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante cuando puede afectar a la expresión de esa secuencia codificante, es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor. Las secuencias codificantes pueden estar operativamente unidas a secuencias reguladoras en la orientación paralela o antiparalela.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "expresión" se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN paralelo (ARNm) o antiparalelo derivado de la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria. La expresión también se puede referir a la traducción de ARNm en un polipéptido.

Como se usa en la presente memoria, "transformación" se refiere a la transferencia de una molécula de ácido nucleico a un genoma de un organismo hospedante, que da como resultado herencia genéticamente estable. El genoma de la célula hospedante incluye genes cromosómicos y extracromosómicos (p. ej., plásmido). Los organismos hospedantes que contienen las moléculas de ácido nucleico transformadas se denominan organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

Como se usa en la presente memoria, los términos "plásmido", "vector" y "casete" se refieren a un elemento extracromosómico que a menudo lleva genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y normalmente en forma de moléculas de ADN bicatenario circular. Dichos elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias que integran genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, lineales o circulares, de un ADN o ARN monocatenario o bicatenario, derivado de cualquier fuente, en el que se han unido o recombinado una serie de secuencias de nucleótidos en una única construcción que puede introducir un fragmento de promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con la secuencia 3' no traducida adecuada en una célula. "Casete de transformación" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que facilitan la transformación de una célula hospedante particular. "Casete de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que permiten la expresión mayor de ese gen en un hospedante extraño.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "software de análisis de secuencias" se refiere a cualquier algoritmo de ordenador o programa de software que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. El "software de análisis de secuencias" puede estar disponible en el mercado o ser desarrollado independientemente. El software de análisis de secuencias típico incluirá el paquete de programas de GCG (Wisconsin Package Versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)), y DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 USA), CLUSTALW (por ejemplo, versión 1.83; Thompson et al., *Nucleic Acids Research*, 22(22):4673-4680 (1994)), y el programa FASTA que incorpora el algoritmo de Smith-Waterman (W. R. Pearson, *Comput. Methods Genome Res.*, [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Publisher: Plenum, New York, NY), Vector NTI (Informax, Bethesda, MD) y Sequencher v. 4.05. Dentro del contexto de esta solicitud, se entenderá que donde se use software de análisis de secuencias para el análisis, los resultados del análisis se basarán en los "valores por defecto" del programa de referencia, salvo que se especifique otra cosa. Como se usa en la presente memoria, los "valores por defecto" significarán cualquier conjunto de valores o parámetros establecidos por el fabricante del software que se cargan originalmente con el software cuando se inicializa por primera vez.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "contaminantes biológicos" se refiere a una o más entidades biológicas patógenas y/o no deseadas que incluyen microorganismos, esporas, virus, priones y sus mezclas. El procedimiento produce una concentración eficaz de al menos un ácido percarboxílico útil para reducir y/o eliminar la presencia de contaminantes biológicos viables. En una realización preferida, el contaminante biológico es un microorganismo patógeno viable.

Como se usa en la presente memoria, el término "desinfectar" se refiere a un procedimiento de destrucción de o prevención del crecimiento de contaminantes biológicos. Como se usa en la presente memoria, el término "desinfectante" se refiere a un agente que desinfecta destruyendo, neutralizando o inhibiendo el crecimiento de contaminantes biológicos. Típicamente, los desinfectantes se usan para tratar objetos inanimados o superficies. Como se usa en la presente memoria, el término "desinfección" se refiere al acto o procedimiento de desinfectar. Como se usa en la presente memoria, el término "antiséptico" se refiere a un agente químico que inhibe el crecimiento de microorganismos portadores de enfermedades. En un aspecto, los contaminantes biológicos son microorganismos patógenos.

Como se usa en la presente memoria, el término "higiénico" significa o se refiere al restablecimiento o conservación de la salud, típicamente eliminando, previniendo o controlando un agente que puede ser perjudicial para la salud. Como se usa en la presente memoria, el término "higienizar" significa hacer higiénico. Como se usa en la presente memoria, el término "higienizante" se refiere a un agente de higienización. Como se usa en la presente memoria, el término "higienización" se refiere al acto o procedimiento de higienizar.

Como se usa en la presente memoria, el término "viricida" se refiere a un agente que inhibe o destruye virus, y es sinónimo de "virulicida". Un agente que presenta la capacidad de inhibir o destruir virus se describe como que tiene actividad "viricida". Los perácidos pueden tener actividad viricida. Los viricidas alternativos típicos conocidos en la técnica que pueden ser adecuados para usar con la presente invención incluyen, por ejemplo, alcoholes, éteres, cloroformo, formaldehído, fenoles, beta-propiolactona, yodo, cloro, sales de mercurio, hidroxilamina, óxido de etileno, etilenglicol, compuestos de amonio cuaternario, enzimas y detergentes.

Como se usa en la presente memoria, el término "biocida" se refiere a un agente químico, típicamente de amplio espectro, que inactiva o destruye microorganismos. Un agente químico que presenta la capacidad de inactivar o destruir microorganismos se describe como que tiene actividad "biocida". Los perácidos pueden tener actividad biocida. Los biocidas alternativos típicos conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, cloro, dióxido de cloro, cloroisocianuratos, hipocloritos, ozono, acroleína, aminas, compuestos fenólicos clorados, sales de cobre, compuestos de organoazufre y sales de amonio cuaternario.

Como se usa en la presente memoria, la frase "concentración biocida mínima" se refiere a la concentración mínima de un agente biocida que, durante un tiempo de contacto específico, producirá una reducción irreversible, letal deseada en la población viable de los microorganismos a los que se dirige. La eficacia se puede medir por el \log_{10} de la reducción de microorganismos viables después de tratamiento. En un aspecto, la reducción objetivo de microorganismos viables después de tratamiento es al menos una reducción de 3-log, más preferiblemente al menos una reducción de 4-log y lo más preferiblemente al menos una reducción de 5-log. En otro aspecto, la concentración biocida mínima es al menos una reducción 6-log de células microbianas viables.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "fuente peroxígeno" y "fuente de peroxígeno" se refieren a compuestos capaces de proporcionar peróxido de hidrógeno en una concentración de aproximadamente 1 mM o más cuando están en una disolución acuosa, que incluyen peróxido de hidrógeno, aductos de peróxido de hidrógeno (p. ej., aducto de urea-peróxido de hidrógeno (peróxido de carbamida)), perboratos y percarbonatos. Como se describe en la presente memoria, la concentración de peróxido de hidrógeno proporcionada por el compuesto de peroxígeno en la formulación de reacción acuosa inicialmente es al menos 1 mM o más tras combinar los componentes de reacción. En una realización, la concentración de peróxido de hidrógeno en la formulación de reacción acuosa es al menos 10 mM. En otra realización, la concentración de peróxido de hidrógeno en la formulación de reacción acuosa es al menos 100 mM. En otra realización, la concentración de peróxido de hidrógeno en la formulación de reacción acuosa es al menos 200 mM. En otra realización, la concentración de peróxido de hidrógeno en la formulación de reacción acuosa es 500 mM o más. En otra realización más, la concentración de peróxido de hidrógeno en la formulación de reacción acuosa es 1000 mM o más. La relación molar del peróxido de hidrógeno al sustrato de enzima, p. ej., triglicérido (H_2O_2 :sustrato) en la formulación de reacción acuosa puede ser de aproximadamente 0,002 a 20, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 10, y lo más preferiblemente aproximadamente de 0,5 a 5.

Por "oligosacárido" se entiende compuestos que contienen entre 2 y al menos 24 unidades de monosacárido unidas por enlaces glicosídicos. El término "monosacárido" se refiere a un compuesto de fórmula empírica $(CH_2O)_n$, donde $n \geq 3$, la cadena principal de carbonos no está ramificada, cada átomo de carbono excepto uno contiene un grupo hidroxilo, y el átomo de carbono restante es un aldehído o cetona en el átomo de carbono 2. El término "monosacárido" también se refiere a formas de hemiacetal o hemicetal cíclicas intracelulares.

Como se usa en la presente memoria, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inactiva usada para estabilizar el ingrediente activo en una formulación. Los excipientes a veces también se usan para aumentar el volumen de las formulaciones que contienen los ingredientes activos. Como se describe en la presente memoria, el "ingrediente activo" es un catalizador enzimático que comprende al menos una carbohidrato esterasa CE-7 que tiene actividad de perhidrólisis.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "excipiente oligosacárido" significa un oligosacárido que, cuando se añade a una disolución acuosa de enzima, mejora la estabilidad en el almacenamiento del polvo de enzima secado por atomización resultante o de una formulación del polvo de enzima y un éster de ácido carboxílico y opcionalmente mejora la recuperación/retención de enzima activa (es decir, actividad de perhidrolasa) después de secado por atomización. La adición de excipiente oligosacárido antes del secado por atomización mejora la estabilidad en el almacenamiento de la enzima cuando se almacena en el éster de ácido carboxílico (es decir, una mezcla de almacenamiento sustancialmente exenta de agua). El éster de ácido carboxílico puede contener una concentración muy baja de agua, por ejemplo, la triacetina típicamente tiene entre 180 ppm y 300 ppm de agua. Como se usa en la presente memoria, la frase "sustancialmente exento de agua" se referirá a una concentración de agua en una mezcla del polvo de enzima y el éster de ácido carboxílico que no afecta de forma adversa a la estabilidad en el almacenamiento del polvo de enzima cuando está presente en el éster de ácido carboxílico, es decir, menos de 2000 ppm, preferiblemente menos de 1000 ppm, más preferiblemente menos de 500 ppm, e incluso más preferiblemente menos de 250 ppm de agua en la formulación que comprende el polvo de enzima y el éster de ácido carboxílico.

Polvo de enzima

Se describe en la presente memoria un polvo de enzima que comprende una formulación secada por atomización de al menos una enzima estructuralmente clasificada como una enzima CE-7 y que tiene actividad de perhidrólisis, al menos un excipiente oligosacárido y opcionalmente al menos un tensioactivo. El al menos un excipiente oligosacárido tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1250 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 9000.

La al menos una enzima puede ser cualquiera de las carbohidrato esterases CE-7 descritas en la presente memoria o puede ser cualquier de las carbohidrato esterases CE-7 descritas en las solicitudes de patente de EE.UU. copropiedad, en tramitación junto con la presente nº 2008/0176299 y 2009/0005590. La al menos una enzima se puede seleccionar del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25.

La al menos una enzima está presente en la formulación secada por atomización en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 5% en peso a aproximadamente 75% en peso basado en el peso seco de la formulación secada

por atomización. Un intervalo de % en peso preferido de la enzima en la formulación secada por atomización es de aproximadamente 10% en peso a 50% en peso, y un intervalo de % en peso más preferido de la enzima en la formulación secada por atomización es de aproximadamente 20% en peso a 33% en peso

5 El al menos un excipiente oligosacárido tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1250 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 9000. En algunas realizaciones, el excipiente oligosacárido tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1700 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 15000. Los oligosacáridos específicos útiles en la presente invención incluyen maltodextrina, xilano, manano, fucoidano, galactomanano, chitosán, pectina, inulina, levano, graminano, amilopectina y sus mezclas. Los excipientes basados en oligosacáridos incluyen éteres de
10 celulosa no iónicos, solubles en agua, tales como hidroximetilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa, y sus mezclas.

El excipiente está presente en la formulación en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 95% en peso a aproximadamente 25% en peso basado en el peso seco de la formulación secada por atomización. Un intervalo de % en peso preferido del excipiente en la formulación secada por atomización es de aproximadamente 90% en peso a 50% en peso, y un intervalo de % en peso más preferido del excipiente en la formulación secada por atomización es de aproximadamente 80% en peso a 67% en peso
15

En algunas realizaciones, la formulación comprende además al menos un tensioactivo. Los tensioactivos útiles incluyen tensioactivos iónicos y no iónicos o agentes humectantes, tales como aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso y sorbitán, poloxámeros, ésteres de ácidos graso y sorbitán polioxietilénicos, derivados polioxietilénicos, monoglicéridos y sus derivados etoxilados, diglicéridos o sus
20 derivados polioxietilénicos, docusato de sodio, laurilsulfato de sodio, ácido cólico o sus derivados, lecitinas, fosfolípidos, copolímeros de bloques de etilenglicol y propilenglicol y organosiliconas no iónicas. Preferiblemente, el tensioactivo es un éster de ácido graso y sorbitán polioxietilénico, siendo más preferido el polisorbato 80.

Cuando forma parte de la formulación, el tensioactivo está presente en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 5% en peso a 0,1% en peso basado en el peso de proteína presente en la formulación secada por atomización, preferiblemente de aproximadamente 2% en peso a 0,5% en peso, basado en el peso de proteína presente en la formulación secada por atomización.
25

La formulación secada por atomización puede comprender adicionalmente uno o más tampones (p. ej., sales de sodio y/o potasio de bicarbonato, citrato, acetato, fosfato, pirofosfato, metilfosfato, succinato, malato, fumarato, tartrato o maleato), y un estabilizador de enzima (tal como ácido etilendiaminotetraacético, ácido (1-hidroxi-etilideno)bisfosfónico).
30

El secado por atomización de la formulación de al menos una enzima, al menos un excipiente oligosacárido, y opcionalmente al menos un tensioactivo se lleva a cabo, por ejemplo, como se describe en general en el Spray Drying Handbook, 5ª ed., K. Masters, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1991), y en las publicaciones de patente PCT N° WO 97/41833 (1997) y WO 96/32149 (1996) de Platz, R., et al.

35 En general, el secado por atomización consiste en poner juntos un líquido altamente disperso y un volumen suficiente de aire caliente para producir la evaporación y secado de las gotitas de líquido. Típicamente la alimentación se pulveriza en una corriente de aire filtrado caliente que evapora el disolvente y transporta el producto seco a un colector. Después se extrae el aire gastado con el disolvente. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar varios tipos diferentes de aparatos para proporcionar el producto deseado. Por ejemplo, los secadores por atomización comerciales fabricados por Buchi Ltd. (Postfach, Suiza) o GEA Niro Corp. (Copenhague, Dinamarca) producirán eficazmente partículas de tamaño deseado. Se apreciará además que estos secadores por atomización, y específicamente sus atomizadores, se pueden modificar o personalizar para aplicaciones especializadas, tales como la pulverización simultánea de dos disoluciones usando una técnica de doble boquilla. Más específicamente, una emulsión de agua en aceite se puede atomizar de una boquilla y una disolución que
40 contiene un antiadherente tal como manitol se puede coatomizar de una segunda boquilla. En otros casos puede ser deseable empujar la disolución de alimentación a través de una boquilla de diseño personalizado, usando una bomba de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Con la condición de que se produzcan microestructuras que comprendan la morfología y/o composición correcta, la elección del aparato no es crítica y será evidente para el experto en la técnica a la vista de las enseñanzas de la presente memoria.
45

50 La temperatura tanto de la entrada como de la salida de gas usada para secar el material pulverizado es tal que no produce la degradación de la enzima en el material pulverizado. Dichas temperaturas se determinan típicamente de forma experimental, aunque en general, la temperatura de entrada estará en el intervalo de aproximadamente 50°C a aproximadamente 225°C, mientras que la temperatura de salida estará en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 150°C. Los parámetros preferidos incluyen presiones de atomización en el intervalo de aproximadamente 0,14 MPa - 1,03 MPa (20-150 psi), y preferiblemente de aproximadamente 0,21-0,28 MPa a 0,69 MPa (30-40 a 100 psi). Típicamente la presión de atomización usada será una de las siguientes (MPa) 0,14, 0,21, 0,28, 0,34, 0,41, 0,48, 0,55, 0,62, 0,69, 0,76, 0,83 o superiores.
55

El polvo de enzima secado por atomización o una formulación del polvo de enzima secada por atomización en éster de ácido carboxílico, retiene sustancialmente su actividad enzimática durante un periodo de tiempo prolongado cuando se almacena a temperatura ambiente. El polvo de enzima secado por atomización o una formulación del polvo de enzima secada por atomización en éster de ácido carboxílico, retiene sustancialmente su actividad enzimática a temperaturas elevadas durante periodos cortos de tiempo. En una realización, "retiene sustancialmente su actividad enzimática" significa que el polvo de enzima secado por atomización o una formulación del polvo de enzima secada por atomización en éster de ácido carboxílico retiene aproximadamente 75 por ciento de la actividad enzimática de la enzima en el polvo de enzima secado por atomización o una formulación del polvo de enzima secada por atomización después de un periodo de almacenamiento prolongado a temperatura ambiente y/o después de un periodo de almacenamiento corto a una temperatura elevada (superior a temperatura ambiente) en una formulación compuesta de un éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima, en comparación con la actividad enzimática inicial del polvo de enzima antes de la preparación de una formulación compuesta del éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima. El periodo de almacenamiento prolongado es un periodo de tiempo de aproximadamente un año a aproximadamente dos años a temperatura ambiente. En una realización, el periodo de almacenamiento corto es a una temperatura elevada durante un periodo de tiempo desde cuando se produce la formulación compuesta de un éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima a 40°C hasta aproximadamente ocho semanas a 40°C. En otra realización, la temperatura elevada está en un intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 52°C. En una realización preferida, la temperatura elevada está en un intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C.

En algunas realizaciones, el polvo de enzima secado por atomización tiene al menos 75 por ciento de actividad enzimática de la al menos una enzima después de ocho semanas de almacenamiento a 40°C en una formulación compuesta de un éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima, en comparación con la actividad enzimática inicial del polvo de enzima antes de la preparación de una formulación compuesta del éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima a 40°C. En otras realizaciones, el polvo de enzima tiene al menos 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 por cien de la actividad enzimática de la al menos una enzima después de ocho semanas de almacenamiento a 40°C en una formulación compuesta de un éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima en comparación con la actividad enzimática inicial del polvo de enzima antes de la preparación de una formulación compuesta del éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima a 40°C. Preferiblemente, la actividad de perhidrólisis se mide como se describe en el ejemplo 8-13, véase más adelante, pero se puede usar cualquier método de medición de la actividad de perhidrólisis en la práctica de la presente invención.

En algunas realizaciones, se puede lograr mejora adicional de la actividad enzimática a lo largo de los periodos de tiempo expuestos por adición de un tampón que tiene capacidad de tamponamiento en un intervalo de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,5, a la formulación compuesta del éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima secado por atomización. El tampón adecuado para usar en la formulación puede incluir sal de sodio, sal de potasio o mezclas de sales de sodio o potasio de bicarbonato, pirofosfato, fosfato, metilfosfonato, citrato, acetato, malato, fumarato, tartrato maleato o succinato. Los tampones preferidos para usar en la formulación compuesta del éster de ácido carboxílico y el polvo de enzima secado por atomización incluyen la sal de sodio, sal de potasio o mezclas de sales de sodio o potasio de bicarbonato, fosfato, metilfosfonato o citrato.

En realizaciones donde está presente un tampón en la formulación de éster de ácido carboxílico y polvo de enzima, el tampón puede estar presente en un intervalo de aproximadamente 0,01% en peso a aproximadamente 50% en peso, basado en el peso del éster de ácido carboxílico en la formulación compuesta de éster de ácido carboxílico y polvo de enzima. El tampón puede estar presente en un intervalo más preferido de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 10% basado en el peso del éster de ácido carboxílico en la formulación compuesta de éster de ácido carboxílico y polvo de enzima. Además, en estas realizaciones, la comparación entre las actividades de perhidrólisis de la enzima se determina entre (a) un polvo de enzima que retiene al menos 75 por ciento de la actividad de perhidrólisis de la al menos una enzima después de ocho semanas de almacenamiento a 40°C en una formulación compuesta de un éster de ácido carboxílico, un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento en un intervalo de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,5, y el polvo de enzima, y (b) la actividad de perhidrólisis inicial del polvo de enzima antes de la preparación de una formulación compuesta del éster de ácido carboxílico, el tampón que tiene una capacidad de tamponamiento en un intervalo de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,5, y el polvo de enzima.

Se pretende que el polvo de enzima secado por atomización sea almacenado como una formulación en el compuesto orgánico que es un sustrato para la al menos una enzima, tal como triacetina. En ausencia de peróxido de hidrógeno añadido, la triacetina normalmente es hidrolizada en disolución acuosa por una carbohidrato esterasa CE-7 para producir diacetina y ácido acético, y la producción de ácido acético produce una disminución en el pH de la mezcla de reacción. Un requisito para la estabilidad en el almacenamiento a largo plazo de la enzima en triacetina es que no haya reacción significativa de la triacetina con nada de agua que pueda estar presente en la triacetina; la especificación para el contenido de agua en una triacetina comercial (suministrada por Tessengerlo Group, Brussels, Bélgica) es 0,03% en peso de agua (300 ppm). Cualquier hidrólisis de la triacetina que se produzca durante el almacenamiento de la enzima en triacetina produciría ácido acético, lo que podría producir una disminución de la actividad o inactivación de la actividad de perhidrólisis de las carbohidrato esterasas CE-7; la actividad de perhidrólisis de las carbohidrato esterasas CE-7 típicamente es inactivada a o por debajo de pH 5,0 (véase, la

solicitud de patente de EE.UU. nº 12/539.025 de DiCosimo, R., et al.). El excipiente oligosacárido seleccionado para usar en la presente solicitud debe proporcionar estabilidad de la enzima en el sustrato orgánico para la enzima en condiciones donde se pueda generar ácido acético debido a la presencia de concentraciones bajas de agua en la formulación.

- 5 Condiciones de reacción adecuadas para la preparación de perácidos catalizada por enzimas a partir de ésteres de ácidos carboxílicos y peróxido de hidrógeno

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir una formulación acuosa que comprende un perácido, haciendo reaccionar uno o más ésteres de ácidos carboxílicos con una fuente de peroxígeno (peróxido de hidrógeno, perborato de sodio o percarbonato de sodio) en presencia de una formulación descrita antes que comprende un catalizador enzimático que tiene actividad de perhidrólisis. El catalizador enzimático comprende al menos una enzima que tiene actividad de perhidrólisis, en donde dicha enzima se clasifica estructuralmente como un miembro de la familia de carbohidrato esterasas CE-7 (CE-7; véase Coutinho, P.M., Henrissat, B., véase antes). En otra realización, el catalizador de perhidrolasa se clasifica estructuralmente como una cefalosporina C desacetilasa. En otra realización, el catalizador de perhidrolasa se clasifica estructuralmente como una acetil xilan esterasa.

En una realización, el catalizador de perhidrolasa comprende una enzima que tiene actividad de perhidrólisis y un motivo identificativo que comprende:

- a) un motivo RGQ como restos de aminoácidos 118-120;
- b) un motivo GXSQG en los restos de aminoácidos 179-183; y
- 20 c) un motivo HE como restos de aminoácidos 298-299 cuando se alinea con la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1 usando CLUSTALW.

En una realización adicional, el motivo identificativo comprende adicionalmente un cuarto motivo conservado definido como un motivo LXD en los restos de aminoácidos 267-269 cuando se alinea con la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1 usando CLUSTALW.

- 25 En otra realización, el catalizador de perhidrolasa comprende una enzima que tiene el presente motivo identificativo y al menos 30% de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el catalizador de perhidrolasa comprende una enzima que tiene actividad de perhidrolasa seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25.

- 30 En otra realización, el catalizador de perhidrolasa comprende una enzima que tiene al menos 40% de identidad de aminoácidos con un motivo identificativo contiguo definido como SEQ ID NO: 18, en donde se conservan los motivos conservados descritos antes (es decir, RGQ, GXSQG y HE, y opcionalmente, LXD)

En otra realización, el catalizador de perhidrolasa comprende una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25, en donde dicha enzima puede tener una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones siempre que se conserve el motivo identificativo y se retenga la actividad de perhidrolasa.

Los sustratos ésteres de ácidos carboxílicos adecuados pueden incluir ésteres que tengan la siguiente fórmula:



en donde X = es un grupo éster de fórmula $R_6C(O)O$

- 40 R_6 = resto hidrocarbilo lineal, ramificado o cíclico, C1 a C7, opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo o grupos alcoxi C1 a C4, en donde R_6 opcionalmente comprende uno o más enlaces éter donde R_6 = C2 a C7;

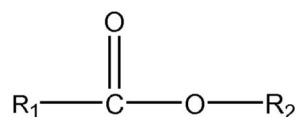
R_5 = un resto hidrocarbilo lineal, ramificado o cíclico, C1 a C6, opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo; en donde cada átomo de carbono en R_5 comprende individualmente no más de un grupo hidroxilo o no más de un grupo éster;

- 45 en donde R_5 opcionalmente comprende uno o más enlaces éter;

m = de 1 al número de átomos de carbono en R_5 ; y

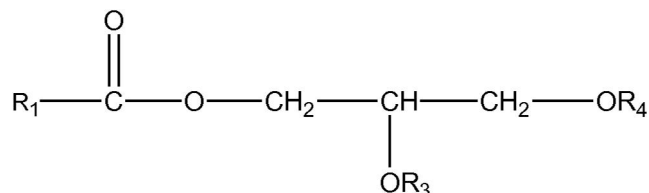
en donde dichos ésteres tienen una solubilidad en agua de al menos 5 ppm a 25°C.

En otras realizaciones, los sustratos adecuados pueden incluir también ésteres de fórmula:



en donde R_1 = alquilo de cadena lineal o cadena ramificada C1 a C7, opcionalmente sustituido con un hidroxilo o un grupo alcoxi C1 a C4 y R_2 = alquilo de cadena lineal o cadena ramificada C1 a C10, alqueno, alquino, arilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroarilo, $(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$ o $(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O})_n\text{H}$ y n = de 1 a 10.

- 5 En otras realizaciones, los sustratos ésteres de ácidos carboxílicos pueden incluir glicéridos de fórmula:



en donde R_1 = alquilo de cadena lineal o cadena ramificada C1 a C7, opcionalmente sustituido con un hidroxilo o un grupo alcoxi C1 a C4 y R_3 y R_4 son individualmente H o $\text{R}_1\text{C}(\text{O})$.

- 10 En otras realizaciones, R_6 es resto hidrocarbilo lineal C1 a C7, opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo o grupos alcoxi C1 a C4, que comprende opcionalmente uno o más enlaces éter. En otras realizaciones preferidas, R_6 es resto hidrocarbilo lineal C2 a C7, opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo y/o que comprende opcionalmente uno o más enlaces éter.

- 15 En otras realizaciones, los sustratos ésteres de ácidos carboxílicos adecuados también pueden incluir sacáridos acetilados seleccionados del grupo que consiste en mono, di y polisacáridos acetilados. En realizaciones preferidas, los sacáridos acetilados incluyen mono, di y polisacáridos acetilados. En otras realizaciones, los sacáridos acetilados se seleccionan del grupo que consiste en xilano acetilado, fragmentos de xilano acetilado, xilosa acetilada (tal como tetraacetato de xilosa), glucosa acetilada (tal como pentaacetato de glucosa), β -D-ribofuranosa-1,2,3,5-tetraacetato, tri-O-acetil-D-galactal, tri-O-acetil-D-glucal, y celulosa acetilada. En realizaciones preferidas, el sacárido acetilado se selecciona del grupo que consiste en β -D-ribofuranosa-1,2,3,5-tetraacetato, tri-O-acetil-D-galactal, tri-O-acetil-D-glucal, y celulosa acetilada. Como tales, los carbohidratos acetilados pueden ser sustratos adecuados para generar ácidos peroxicarboxílicos usando los presentes métodos y sistemas (es decir, en presencia de una fuente de peroxígeno).

- 25 En realizaciones adicionales, el sustrato éster de ácido carboxílico puede incluir monoacetina; triacetina; monopropionina; dipropionina; tripropionina; monobutirina; dibutirina; tributirina; pentaacetato de glucosa; tetraacetato de xilosa; xilano acetilado; fragmentos de xilano acetilado; β -D-ribofuranosa-1,2,3,5-tetraacetato; tri-O-acetil-D-galactal; tri-O-acetilglucal; diacetato de propilenglicol; diacetato de etilenglicol; monoésteres o diésteres de 1,2-etanodiol; 1,2-propanodiol; 1,3-propanodiol; 1,2-butanodiol; 1,3-butanodiol; 2,3-butanodiol; 1,4-butanodiol; 1,2-pentanodiol; 2,5-pentanodiol; 1,6-pentanodiol, 1,2-hexanodiol; 2,5-hexanodiol; 1,6-hexanodiol o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones preferidas de los presentes métodos y sistemas, el sustrato comprende triacetina.

- 35 El éster de ácido carboxílico está presente en la formulación de reacción en una concentración suficiente para producir la concentración deseada de perácido tras la perhidrólisis catalizada por enzima. No es necesario que el éster de ácido carboxílico sea completamente soluble en la formulación de la reacción, pero que tenga suficiente solubilidad para permitir la conversión del éster por el catalizador de perhidrolasa en el correspondiente perácido. El éster de ácido carboxílico está presente en la formulación de la reacción en una concentración de 0,05% en peso a 40% en peso de la formulación de la reacción, preferiblemente en una concentración de 0,1% en peso a 20% en peso de la formulación de la reacción, y más preferiblemente en una concentración de 0,5% en peso a 10% en peso de la formulación de la reacción.

- 40 La fuente de peroxígeno puede incluir peróxido de hidrógeno, aductos de peróxido de hidrógeno (p. ej., aducto de urea-peróxido de hidrógeno (peróxido de carbamida)) sales de perborato y sales de percarbonato. La concentración del compuesto de peroxígeno en la formulación de la reacción puede estar en el intervalo de 0,0033% en peso a aproximadamente 50% en peso, preferiblemente de 0,033% en peso a aproximadamente 40% en peso, más preferiblemente de 0,33% en peso a aproximadamente 30% en peso.

- 45 Muchos catalizadores de perhidrolasa (células enteras, células enteras permeabilizadas y extractos de células enteras parcialmente purificados) se ha descrito que tienen actividad de catalasa (EC 1.11.1.6). Las catalasas catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. En un aspecto, el catalizador de perhidrólisis carece de actividad de catalasa. En otro aspecto, se añade un inhibidor de catalasa a la formulación de la reacción. Los ejemplos de inhibidores de catalasa incluyen azida sódica y sulfato de hidroxilamina. Un experto en la técnica puede ajustar la concentración del inhibidor de catalasa según sea necesario. La concentración del inhibidor de

5 catalasa típicamente está en el intervalo de 0,1 mM a aproximadamente 1 M; preferiblemente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM; más preferiblemente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM. En un aspecto, la concentración de azida sódica típicamente está en el intervalo de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 60 mM, mientras que la concentración del sulfato de hidroxilamina típicamente es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 30 mM, preferiblemente aproximadamente 10 mM.

10 En otra realización, el catalizador enzimático carece de actividad de catalasa significativa o se diseña para disminuir o eliminar la actividad de catalasa. La actividad de catalasa en una célula hospedante se puede regular por disminución o eliminar por alteración de la expresión del gen o genes responsables de la actividad de catalasa usando técnicas bien conocidas que incluyen mutagénesis de transposones, expresión de ARN antiparalelo, mutagénesis dirigida y mutagénesis aleatoria. En una realización preferida, el gen o genes que codifican la actividad de catalasa endógena son regulados por disminución o alterados (es decir, inactivados). Como se usa en la presente memoria, un gen "alterado" es uno en el que la actividad y/o función de la proteína codificada por el gen modificado ya no está presente. Los medios para alterar un gen son bien conocidos en la técnica y pueden incluir inserciones, eliminaciones o mutaciones en el gen siempre que ya no está presente la actividad y/o función de la proteína correspondiente. En una realización preferida adicional, el hospedante de producción es un hospedante de producción *E. coli* que comprende un gen de catalasa alterado seleccionado del grupo que consiste en *katG* y *katE* (véase la solicitud de patente de EE.UU. publicada N° 2008-0176299). En otra realización, el hospedante de producción es una cepa de *E. coli* que comprende una regulación por disminución y/o alteración en los genes de catalasa tanto *katg1* como *katE*.

20 La concentración del catalizador en la formulación de la reacción acuosa depende de la actividad catalítica específica del catalizador, y se elige para obtener la velocidad de reacción deseada. El peso del catalizador en las reacciones de perhidrólisis típicamente está en el intervalo de 0,0001 mg a 10 mg por ml de volumen de reacción total, preferiblemente de 0,001 mg a 2,0 mg por ml. El catalizador de también se puede inmovilizar sobre un soporte soluble o insoluble usando métodos bien conocidos para los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, Immobilization of Enzymes and Cells; Gordon F. Bickerstaff, Editor; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 1997. El uso de catalizadores inmovilizados permite la recuperación y reutilización del catalizador en reacciones posteriores. El catalizador enzimático puede estar en forma de células microbianas enteras, células microbianas permeabilizadas, extractos de células microbianas, enzimas parcialmente purificadas o purificadas, y sus mezclas.

30 En un aspecto, la concentración de perácido generada por la combinación de perhidrólisis química y perhidrólisis enzimática del éster de ácido carboxílico es suficiente para proporcionar una concentración eficaz de perácido para blanqueo o desinfección a un pH deseado. En otro aspecto, los presentes métodos proporcionan combinaciones de enzimas y sustratos de enzimas para producir la concentración eficaz deseada de perácido, donde, en ausencia de enzima añadida, hay una concentración significativamente menor de perácido producido. Aunque en algunos casos puede haber perhidrólisis química sustancial del sustrato enzimático por reacción química directa de peróxido inorgánico con el sustrato enzimático, puede no haber una concentración suficiente de perácido generado para proporcionar una concentración eficaz de perácido en las aplicaciones deseadas, y se logra un aumento significativo de la concentración de perácido total por la adición de un catalizador de perhidrolasa adecuado a la formulación de la reacción.

40 La concentración de perácido generada (tal como ácido peracético) por la perhidrólisis de al menos un éster de ácido carboxílico es al menos aproximadamente 20 ppm, preferiblemente al menos 100 ppm, más preferiblemente al menos aproximadamente 200 ppm de perácido, más preferiblemente al menos 300 ppm, más preferiblemente al menos 500 ppm, más preferiblemente al menos 700 ppm, más preferiblemente al menos aproximadamente 1000 ppm de perácido, lo más preferiblemente al menos 2000 ppm de perácido en el espacio de 10 minutos, preferiblemente en el espacio de 5 minutos, más preferiblemente en el espacio de 1 minuto de inicio de la reacción de perhidrólisis. La formulación del producto que comprende el perácido se puede diluir opcionalmente con agua, o una disolución compuesta predominantemente de agua, para producir una formulación con la concentración de perácido menor deseada. En un aspecto, el tiempo de reacción requerido para producir la concentración deseada de perácido no es mayor de aproximadamente dos horas, preferiblemente no mayor de aproximadamente 30 minutos, más preferiblemente no mayor de aproximadamente 10 minutos, y lo más preferiblemente en aproximadamente 5 minutos o menos. En otros aspectos, una superficie dura u objeto inanimado contaminado con un contaminante(s) biológico(s) se pone en contacto con el perácido formado de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria en el espacio de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 168 horas de la combinación de dichos componentes de reacción, o en el espacio de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 48 horas, o en el espacio de aproximadamente 5 minutos a 2 horas de la combinación de dichos componentes de reacción, o cualquier intervalo de tiempo dentro de los mismos.

55 En otro aspecto, el ácido peroxicarboxílico formado de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria se usa en una aplicación para el cuidado de la ropa, en donde el ácido peroxicarboxílico se pone en contacto con un artículo de ropa o un producto textil para proporcionar un beneficio, tal como desinfección, blanqueo, decoloración, higienización, desodorización o una combinación de los mismos. El ácido peroxicarboxílico se puede usar en una variedad de productos para el cuidado de la ropa que incluyen tratamientos de prelavado de productos textiles, detergentes para ropa, quitamanchas, composiciones de blanqueo, composiciones

60

desodorizantes y agentes de aclarado. En una realización, el presente procedimiento para producir un ácido peroxycarboxílico para una superficie objetivo se lleva a cabo in situ.

En el contexto de las aplicaciones del cuidado de la ropa, la expresión "poner en contacto un artículo de ropa o producto textil" significa que el artículo de ropa o producto textil se expone a una formulación descrita en la presente memoria. Para este fin, hay una serie de formatos que pueden ser usados en la formulación para tratar artículos de ropa o productos textiles, que incluyen líquido, sólidos, gel, pasta, barras, comprimidos, pulverizador, espuma, polvo o gránulos y se pueden suministrar por dosificación manual, dosificación unitaria, dosificación desde un sustrato, pulverización y dosificación automática de una lavadora o secadora. Las composiciones granulares también pueden estar en forma compacta; las composiciones líquidas también pueden estar en una forma concentrada.

Cuando las formulaciones descritas en la presente memoria se usan en una lavadora, la formulación puede contener además componentes típicos para detergentes para ropa. Por ejemplo, los componentes típicos incluyen tensioactivos, agentes blanqueantes, activadores de blanqueo, enzimas adicionales, supresores de espuma, dispersantes, dispersantes de jabón de cal, agentes de suspensión y antirredeposición de la suciedad, agentes suavizantes, inhibidores de la corrosión, inhibidores de suciedad, germicidas, agentes de ajuste del pH, fuentes de alcalinidad no mejoradoras de la detergencia, agentes quelantes, cargas orgánicas y/u inorgánicas, disolventes, hidrótropos, abrillantadores ópticos, colorantes y perfumes.

Las formulaciones descritas en la presente memoria también se pueden usar como productos aditivos de detergentes en forma sólida o líquida. Dichos productos aditivos se pretende que complementen o refuercen el rendimiento de las composiciones de detergentes convencionales y se pueden añadir en cualquier etapa del procedimiento de limpieza.

En relación con los presentes sistemas y métodos para el cuidado de la ropa donde el perácido se genera para uno o más de blanqueo, eliminación de manchas y reducción de olor, la concentración de perácido generado (p. ej., ácido peracético) por la perhidrólisis de al menos un éster de ácido carboxílico puede ser al menos aproximadamente 2 ppm, preferiblemente al menos 20 ppm, preferiblemente al menos 100 ppm, y más preferiblemente al menos aproximadamente 200 ppm de perácido. En relación con los presentes sistemas y métodos para el cuidado de la ropa donde se genera el perácido para desinfección o higienización, la concentración de perácido generado (p. ej., ácido peracético) por la perhidrólisis de al menos un éster de ácido carboxílico puede ser al menos de aproximadamente 2 ppm, más preferiblemente al menos 20 ppm, más preferiblemente al menos 200 ppm, más preferiblemente al menos 500 ppm, más preferiblemente al menos 700 ppm, más preferiblemente al menos aproximadamente 1000 ppm de perácido, lo más preferiblemente al menos 2000 ppm de perácido en el espacio de 10 minutos, preferiblemente en el espacio de 5 minutos, y lo más preferiblemente en el espacio de 1 minuto del inicio de la reacción de perhidrólisis. La mezcla del producto que comprende el perácido se puede diluir opcionalmente con agua, o una disolución compuesta predominantemente de agua, para producir una mezcla con la concentración de perácido menor deseada. En un aspecto de los presentes métodos y sistemas, el tiempo de reacción requerido para producir la concentración deseada de perácido no es mayor de aproximadamente dos horas, preferiblemente no mayor de aproximadamente 30 minutos, más preferiblemente no mayor de aproximadamente 10 minutos, incluso más preferiblemente no mayor de aproximadamente 5 minutos, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1 minuto o menos.

La temperatura de la reacción se elige para controlar tanto la velocidad de reacción como la estabilidad de la actividad del catalizador enzimático. La temperatura de la reacción puede estar en el intervalo de justo por encima del punto de congelación de la formulación de la reacción (aproximadamente 0°C) a aproximadamente 95°C, con un intervalo preferido de temperatura de reacción de aproximadamente 5°C a aproximadamente 55°C.

El pH de la formulación de la reacción final que contiene perácido es de aproximadamente 2 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, incluso más preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8, y todavía incluso más preferiblemente de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5. En otra realización, el pH de la formulación de la reacción es ácido (pH <7). El pH de la reacción, y de la formulación de la reacción final, se puede controlar opcionalmente por la adición de un tampón adecuado, que incluye bicarbonato, pirofosfato, fosfato, metilfosfonato, citrato, acetato, malato, fumarato, tartrato maleato o succinato. La concentración de tampón, cuando se usa, típicamente es de 0,1 mM a 1,0 M, preferiblemente de 1 mM a 300 mM, lo más preferiblemente de 10 mM a 100 mM.

En otro aspecto, la formulación de la reacción de perhidrólisis enzimática puede contener un disolvente orgánico que actúa como un dispersante para aumentar la velocidad de disolución del éster de ácido carboxílico en la formulación de la reacción. Dichos disolventes incluyen éter metílico del propilenglicol, acetona, ciclohexanona, éter butílico del dietilenglicol, éter metílico del tripropilenglicol, éter metílico del dietilenglicol, éter butílico del propilenglicol, éter metílico del dipropilenglicol, ciclohexanol, alcohol bencílico, isopropanol, etanol, propilenglicol, y sus mezclas.

En otro aspecto, el producto de perhidrólisis enzimática puede contener componentes adicionales que proporcionan funcionalidad deseable. Estos componentes adicionales incluyen tampones, mejoradores de la detergencia, agentes

espesantes, emulsionantes, tensioactivos, agentes humectantes, inhibidores de la corrosión (tales como benzotriazol), estabilizadores de enzimas y estabilizadores de peróxido (p. ej., agentes quelantes de iones metálicos). Muchos de los componentes adicionales son bien conocidos en la industria de los detergentes (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.932.532). Los ejemplos de emulsionantes incluyen poli(alcohol vinílico) o polivinilpirrolidona. Los ejemplos de agentes espesantes incluyen LAPONITE® RD, almidón de maíz, PVP, CARBOWAX®, CARBOPOL®, CABOSIL®, polisorbato 20, PVA y lecitina. Los ejemplos de sistemas de tamponamiento incluyen fosfato de sodio monobásico/fosfato de sodio dibásico; ácido sulfámico/trietanolamina; ácido cítrico/trietanolamina; ácido tartárico/trietanolamina; ácido succínico/trietanolamina; y ácido acético/trietanolamina. Los ejemplos de tensioactivos incluyen a) tensioactivos no iónicos tales como copolímeros de bloques de óxido de etileno u óxido de propileno, alcoholes primarios y secundarios lineales y ramificados etoxilados o propoxilados, y óxidos de fosfina alifáticos; b) tensioactivos catiónicos tales como compuestos de amonio cuaternario, en particular compuestos de amonio cuaternario que tienen un grupo alquilo C8-C20 unido a un átomo de nitrógeno adicionalmente unido a tres grupos alquilo C1-C2; c) tensioactivos aniónicos tales como ácidos alcanocarboxílicos (p. ej., ácidos grasos C8-C20), alquilfosfonatos, alcanosulfonatos (p. ej., dodecilsulfato de sodio "SDS") o alquilbencenosulfonatos lineales o ramificados, alcanosulfonatos; y d) tensioactivos anfóteros y de ion híbrido, tales como ácidos aminocarboxílicos, ácidos aminodicarboxílicos, alquilbetainas y sus mezclas. Componentes adicionales pueden incluir fragancias, colorantes, estabilizantes de peróxido de hidrógeno (p. ej., quelantes de metales tales como ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfónico (DEQUEST® 2010, Solutia Inc., St. Louis, MO y ácido etilenediaminotetraacético (EDTA)), TURPINAL® SL (n° CAS 2809-21-4), DEQUEST® 0520, DEQUEST® 0531, estabilizantes de la actividad enzimática (p. ej., polietilenglicol (PEG)), y mejoradores de la detergencia.

Producción in situ de perácidos usando un catalizador de perhidrolasa

Las cefalosporina C desacetilasas (E.C. 3.1.1.41; nombre sistemático cefalosporina C acetilhidrolasas; CAH) son enzimas que tiene la capacidad de hidrolizar el enlace éster del acetilo en las cefalosporinas tales como la cefalosporina C, ácido 7-aminocefalosporánico y ácido 7-(tiofeno-2-acetamido)cefalosporánico (Abbott, B. y Fukuda, D., *Appl. Microbiol.* 30(3):413-419 (1975)). Las CAH pertenecen a una familia mayor de enzimas estructuralmente relacionadas denominadas la familia siete de carbohidrato esterasas ("CE-7"; Coutinho, P.M., Henrissat, B., véase antes).

La familia de carbohidrato esterasas CE-7 incluye tanto las CAH como las acetil xilan esterasas (AXE; E.C. 3.1.1.72). Los miembros de la familia CE-7 comparten un motivo estructural común y son bastante inusuales en cuanto que típicamente presentan actividad de hidrólisis de éster tanto para xilooligosacáridos acetilados como para cefalosporina C acetilada, sugiriendo que la familia CE-7 representa una sola clase de proteínas con una actividad de desacetilasa multifuncional contra una variedad de sustratos pequeños (Vincent et al., véase antes). Vincent et al., describen la similitud estructural entre los miembros de esta familia y define un motivo de secuencia identificativa característica de la familia CE-7.

Los miembros de la familia CE-7 se encuentran en plantas, hongos (p. ej., *Cephalosporidium acremonium*), levaduras (p. ej., *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*), y bacterias tales como *Thermoanaerobacterium* sp.; *Nocardia lactamdurans*, y varios miembros del género *Bacillus* (Politino et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(12):4807-4811 (1997); Sakai et al., *J. Ferment. Bioeng.* 85:53-57 (1998); Lorenz, W. y Wiegel, J., *J. Bacteriol.* 179:5436-5441 (1997); Cardoza et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54(3):406-412 (2000); Mitsushima et al., véase antes; Abbott, B. y Fukuda, D., *Appl. Microbiol.* 30(3):413-419 (1975); Vincent et al., véase antes; Takami et al., *NAR*, 28(21):4317-4331 (2000); Rey et al., *Genome Biol.*, 5(10): artículo 77 (2004); Degrossi et al., *Microbiology.*, 146:1585-1591 (2000); patente de EE.UU. 6.645.233; patente de EE.UU. 5.281.525; patente de EE.UU. 5.338.676; y WO 99/03984.

El documento WO2007/070609 y las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU. N° 2008/0176299 y 2008/176783 de DiCosimo et al. describen varias enzimas estructuralmente clasificadas como enzimas CE-7 que tienen actividad de perhidrólisis adecuada para producir concentraciones eficaces de perácidos a partir de una variedad de sustratos ésteres de ácidos carboxílicos cuando se combinan con una fuente de peroxígeno. También se describen variantes de enzimas CE-7 que tienen mejor actividad de perhidrólisis en la solicitud de patente de EE.UU. copresentada, copropiedad y en tramitación junto con la presente (N° de expediente del apoderado CL4392 US NA).

El presente método produce concentraciones eficaces, útiles industrialmente de perácidos in situ en condiciones de reacción acuosas usando la actividad de perhidrolasa de una enzima que pertenece a la familia CE-7 de las carbohidrato esterasas.

Método de ensayo de HPLC para determinar la concentración de perácido y peróxido de hidrógeno.

Se puede usar una variedad de métodos analíticos en los presentes métodos para analizar los reaccionantes y productos, que incluyen valoración, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases (GC), espectroscopía de masas (MS), electroforesis capilar (CE), el procedimiento analítico descrito por U. Karst et al., (*Anal. Chem.*, 69(17):3623-3627 (1997)), y el ensayo del 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona)-6-sulfonato (ABTS) (S.

Minning, et al., *Analytica Chimica Acta* 378:293-298 (1999) y el documento WO 2004/058961 A1) como se describe en los presentes ejemplos.

Determinación de la concentración biocida mínima de perácidos

5 El método descrito por J. Gabrielson, et al. (*J. Microbiol. Methods* 50: 63-73 (2002)) se puede usar para la determinación de la concentración mínima biocida (MBC) de perácidos, o de peróxido de hidrógeno y sustratos enzimáticos. El método de ensayo se basa en la inhibición de la reducción de XTT, donde XTT ((2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil]-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio, sal interna, sal monosódica) es un colorante de oxidorreducción que indica la actividad respiratoria microbiana por un cambio en la densidad óptica (OD) medida a 490 nm o 450 nm. Sin embargo, hay una variedad de otros métodos disponibles para ensayar la actividad de desinfectantes y antisépticos que incluyen recuentos en placa de viables, recuentos microscópicos directos, peso seco, mediciones de turbidez, absorbancia y bioluminiscencia (véase, por ejemplo, Brock, Semour S., *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA; 2001).

Usos de composiciones de ácido peroxicarboxílico preparadas enzimáticamente

15 El ácido peroxicarboxílico generado por catalizador enzimático producido de acuerdo con el presente método, se puede usar en una variedad de aplicaciones de superficies duras/objetos inanimados para la reducción de concentraciones de contaminantes biológicos, tales como la descontaminación de instrumentos médicos (p. ej., endoscopios), productos textiles (p. ej., prendas de vestir, alfombras), superficies de preparación de alimentos, equipo de almacenamiento de alimentos y envasado de alimentos, materiales usados para el envasado de productos alimenticios, instalaciones de incubación y cría de pollos, recintos para animales y aguas de proceso gastadas, que tienen actividad microbiana y/o viricida. Los ácidos peroxicarboxílicos generados por enzimas se pueden usar en formulaciones diseñadas para inactivar priones (p. ej., determinadas proteasas) para proporcionar adicionalmente actividad biocida. En un aspecto preferido, las presentes composiciones de ácido peroxicarboxílico son particularmente útiles como un agente desinfectante para instrumentos médicos que no se pueden someter al autoclave y equipos de envasado de alimentos. Puesto que la formulación que contiene ácido peroxicarboxílico se puede preparar usando componentes GRAS o de calidad alimentaria (enzima, sustrato enzimático, peróxido de hidrógeno y tampón), el ácido peroxicarboxílico generado por enzima también se puede usar para la descontaminación de carcasas de animales, carne, frutas y verduras, o para la descontaminación de alimentos preparados. El ácido peroxicarboxílico generado por enzima se puede incorporar en un producto cuya forma final es un polvo, líquido, gel, película, sólido o aerosol. El ácido peroxicarboxílico generado por enzima se puede diluir a una concentración que proporcione todavía una descontaminación eficaz.

30 Las composiciones que comprenden una concentración eficaz de ácido peroxicarboxílico se pueden usar para desinfectar superficies y/u objetos contaminados (o que se sospecha que están contaminados) con contaminantes biológicos, poniendo en contacto la superficie u objeto con los productos producidos por los presentes procedimientos. Como se usa en la presente memoria, "poner en contacto" se refiere a poner una composición desinfectante que comprende una concentración eficaz de ácido peroxicarboxílico en contacto con la superficie o el objeto inanimado que se sospecha que está contaminado con un contaminante biológico, durante un periodo de tiempo suficiente para limpiar y desinfectar. Poner en contacto incluye pulverizar, tratar, sumergir, lavar por descarga, verter sobre o en, mezclar, combinar, pintar, recubrir, aplicar, fijar en y comunicar de otra forma una disolución o composición del ácido peroxicarboxílico que comprende una concentración eficaz de ácido peroxicarboxílico, con la superficie o el objeto inanimado que se sospecha que está contaminado con una concentración de un contaminante biológico. Las composiciones desinfectantes se pueden combinar con una composición de limpieza para proporcionar tanto limpieza como desinfección. Alternativamente, se puede incorporar un agente de limpieza (p. ej., un tensioactivo o detergente) en la formulación para proporcionar tanto limpieza como desinfección en una sola composición.

45 Las composiciones que comprenden una concentración eficaz de ácido peroxicarboxílico también pueden contener al menos un agente antimicrobiano adicional, combinaciones de proteasas que degradan priones, un viricida, un esporicida o un biocida. Las combinaciones de estos agentes con el ácido peroxicarboxílico producido por los procedimientos reivindicados pueden proporcionar efectos mayores y/o sinérgicos cuando se usan para limpiar y desinfectar superficies y/u objetos contaminados (o que se sospecha que están contaminados) con contaminantes biológicos. Los agentes antimicrobianos adecuados incluyen ésteres carboxílicos (p. ej., p-hidroxi-benzoatos de alquilo y cinamatos de alquilo); ácidos sulfónicos (p. ej., ácido dodecylbencenosulfónico); compuestos de yodo o compuestos de halógeno activos (p. ej., halógenos elementales, óxidos de halógeno (p. ej., NaOCl, HOCl, HOBr, ClO₂), yodo, interhaluros (p. ej., monoclورو de yodo, dicloruro de yodo, tricloruro de yodo, tetracloruro de yodo, cloruro de bromo, monobromuro de yodo o dibromuro de yodo), polihaluros, sales de hipoclorito, ácido hipocloroso, sales de hipobromito, ácido hipobromoso, cloro- y bromo-hidantoinas, dióxido de cloro y clorito sódico); peróxidos orgánicos que incluyen peróxido de benzoilo, peróxidos de alquilbenzoilo, ozono, generadores de oxígeno singlete, y sus mezclas; derivados fenólicos (tales como o-fenil-fenol, o-bencil-p-clorofenol, *terc*-amil-fenol e hidroxibenzoatos de alquilo-C₁-C₆); compuestos de amonio cuaternario (tales como cloruro de alquildimetilbencilamonio, cloruro de dialquildimetilamonio y sus mezclas); y mezclas de dichos agentes antimicrobianos, en una cantidad suficiente para proporcionar el grado deseado de protección microbiana. Las cantidades eficaces de agentes antimicrobianos

incluyen de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 60% en peso de agente antimicrobiano, de aproximadamente 0,01% en peso a aproximadamente 15% en peso de agente antimicrobiano o de aproximadamente 0,08% en peso a aproximadamente 2,5% en peso de agente antimicrobiano.

5 En un aspecto, los ácidos peroxicarboxílicos formados por el presente procedimiento se pueden usar para reducir la concentración de contaminantes biológicos viables (tales como una población microbiana viable) cuando se aplican sobre y/o en un sitio. Como se usa en la presente memoria, un "sitio" comprende parte o todo de una superficie objetivo adecuada para la desinfección o blanqueo. Las superficies objetivo incluyen todas las superficies que puedan estar potencialmente contaminadas con contaminantes biológicos. Los ejemplos no limitantes incluyen superficies de equipos que se encuentran en la industria de los alimentos o bebidas (tales como tanques, transportadores, suelos, desagües, refrigeradores, congeladores, superficies de equipos, paredes, válvulas, cintas transportadoras, tuberías, desagües, juntas, grietas, y sus combinaciones); superficies de edificios (tales como paredes, suelos y ventanas); tuberías y desagües no relacionados con la industria alimentaria, que incluyen instalaciones de tratamiento de aguas, piscinas y balnearios y tanques de fermentación; superficies hospitalarias y veterinarias (tales como paredes, suelos, camas, equipos (tales como endoscopios), ropa usada en entornos hospitalarios/veterinarios y otros entornos sanitarios, incluyendo ropa, cepillos, zapatos y otras superficies hospitalarias o veterinarias); superficies de restaurantes; superficies de baños; inodoros; ropas y zapatos; superficies de cuadras o establos para ganado, tales como aves de corral, ganado, vacas lecheras, cabras, caballos y cerdos; criaderos para pollos o para gambas; y superficies farmacéuticas o biofarmacéuticas (p. ej., equipo de fabricación farmacéutico o biofarmacéutico, ingredientes farmacéuticos o biofarmacéuticos, excipientes farmacéuticos o biofarmacéuticos). Las superficies duras adicionales también incluyen productos alimenticios tales como carne de vaca, pollo, cerdo, verduras, frutas, mariscos, y sus combinaciones. El sitio también puede incluir materiales absorbentes de agua tales como ropa blanca y otros productos textiles infectados. El sitio también incluye plantas recolectadas o productos de plantas que incluyen semillas, cormos, tubérculos, frutas y verduras, plantas en crecimiento y en especial plantas de cultivos, que incluyen cereales, verduras de hoja y cultivos de ensaladas, hortalizas de raíz, legumbres, frutas de bayas, frutas cítricas y frutas duras.

Los ejemplos de materiales de superficies duras son metales (p. ej., acero, acero inoxidable, cromo, titanio, hierro, cobre, bronce, aluminio y sus aleaciones), minerales (p. ej., cemento), polímeros y plásticos (p. ej., poliolefinas, tales como polietileno, polipropileno, poliestireno, poli(met)acrilato, poli(acrilonitrilo), polibutadieno, poli(acrilonitrilo), butadieno, estireno), poli(acrilonitrilo, butadieno), acrilonitrilo butadieno; poliésteres tales como poli(tereftalato de etileno); y poliamidas tales como nailon). Superficies duras adicionales incluyen ladrillo, teja, cerámica, porcelana, madera, vinilo, linóleo y alfombra.

Los ácidos peroxicarboxílicos formados por el presente procedimiento se pueden usar para proporcionar un beneficio a un producto textil que incluye blanqueo, desinfección, higienización, decoloración y desodorización. Los ácidos peroxicarboxílicos formados por el presente procedimiento se pueden usar en cualquiera de una serie de productos para el cuidado de la ropa que incluyen tratamientos de prelavado de productos textiles, detergentes para ropa, quitamanchas, composiciones de blanqueo, composiciones desodorizantes y agentes de aclarado.

Expresión microbiana recombinante

Los genes y productos génicos de las presentes secuencias se pueden producir en células hospedantes heterólogas, en particular en células de hospedantes microbianos. Las células hospedantes heterólogas preferidas de los presentes genes y moléculas de ácido nucleico son hospedantes microbianos que se pueden encontrar en familias de hongos y bacterias y que crecen en un amplio intervalo de temperatura, valores de pH y tolerancias de disolventes. Por ejemplo, está contemplado que cualquier bacteria, levadura y hongo filamentoso pueda ser hospedante adecuado para la expresión de las presentes moléculas de ácido nucleico. La perhidrolasa puede ser expresada de forma intracelular, extracelular o una combinación tanto intracelular como extracelular, donde la expresión extracelular hace más fácil la recuperación de la proteína deseada de un producto de fermentación que los métodos para la recuperación de proteínas producidas por expresión intracelular. La transcripción, traducción y el aparato biosintético de la proteína permanece invariable con respecto a la materia prima celular usada para generar la biomasa celular; los genes serán expresados independientemente. Los ejemplos de cepas de hospedantes incluyen especies de bacterias, hongos o levaduras tales como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Phaffia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Zymomonas*, *Agrobacterium*, *Erythrobacter*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Corynebacteria*, *Mycobacterium*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Metilomonas*, *Metilobacter*, *Metilococcus*, *Metilosinus*, *Metilomicrobium*, *Metilocystis*, *Alcaligenes*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Anabaena*, *Thiobacillus*, *Methanobacterium*, *Klebsiella* y *Myxococcus*. En una realización, las cepas de hospedantes bacterianos incluyen *Escherichia*, *Bacillus*, *Kluyveromyces* y *Pseudomonas*. En una realización preferida, la célula hospedante bacteriana es *Escherichia coli*.

El crecimiento microbiano y expresión funcional de genes a gran escala puede usar una amplia variedad de carbohidratos simples o complejos, ácidos orgánicos y alcoholes o hidrocarburos saturados, tales como metano o dióxido de carbono en el caso de hospedantes fotosintéticos o quimioautótrofos, forma y cantidad de nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno, carbono o cualquier micronutriente en trazas incluyendo iones inorgánicos pequeños. La

regulación de la velocidad de crecimiento puede estar afectada por la adición o no de moléculas reguladoras específicas al cultivo y que típicamente no se consideran fuentes de nutrientes o energía.

Los vectores o casetes útiles para la transformación de células hospedantes adecuadas son bien conocidos en la técnica. Típicamente el vector o casete contiene secuencias que se dirigen a la transcripción y traducción del gen relevante, un marcador seleccionable y secuencias que permiten la replicación autónoma o integración cromosómica. Los vectores adecuados comprenden una región 5' del gen que alberga controles de inicio de la transcripción y una región 3' del fragmento de ADN que controla la terminación de la transcripción. Es más preferido cuando ambas regiones de control proceden de genes homólogos con la célula hospedante transformada y/o natural para el hospedante de producción, aunque no es necesario que dichas regiones de control sean derivadas de esta forma.

Las regiones de control de inicio o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de la presente región codificante de la cefalosporina C desacetilasa en la célula hospedante deseada, son numerosas y conocidas para los expertos en la técnica. Prácticamente cualquier promotor capaz de dirigir estos genes es adecuado para la presente invención, incluyendo *CYC1*, *HIS3*, *GAL1*, *GAL10*, *ADH1*, *PGK*, *PHO5*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO*, *TPI* (útiles para la expresión en *Saccharomyces*); *AOX1* (útil para la expresión en *Pichia*); y *lac*, *araB*, *tet*, *trp*, *IP_L*, *IP_R*, *T7*, *tac*, y *trc* (útiles para la expresión en *Escherichia coli*) así como los promotores *amy*, *apr*, *npr* y diferentes promotores de fagos útiles para la expresión en *Bacillus*.

Las regiones de control de la terminación también se pueden obtener de diferentes genes naturales para la célula hospedante preferida. En una realización, la inclusión de una región de control de la terminación es opcional. En otra realización, el gen quimérico incluye una región de control de la terminación derivada de la célula hospedante preferida.

Producción industrial

Se pueden aplicar una variedad de metodologías de cultivo para producir el catalizador de perhidrolasa. Por ejemplo, la producción a gran escala de un producto génico específico sobreexpresado a partir de un hospedante microbiano recombinante se puede producir por metodologías de cultivo discontinuo, semicontinuo y continuo. Los métodos de cultivo discontinuo y semicontinuo son comunes y bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar ejemplos en Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Segunda Edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989) y Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36:227 (1992).

La producción comercial del catalizador de perhidrolasa deseado también se puede llevar a cabo con un cultivo continuo. Los cultivos continuos son un sistema abierto donde se añade un medio de cultivo definido de forma continua a un biorreactor y simultáneamente se retira una cantidad igual de medio condicionado para el procesamiento. Los cultivos continuos en general mantienen las células con una densidad de fase líquida alta, donde las células están principalmente en fase de crecimiento logarítmica. Alternativamente, el cultivo continuo se puede poner en práctica con células inmovilizadas donde se añaden continuamente carbono y nutrientes y se retiran continuamente productos valiosos, subproductos o productos residuales de la masa de células. La inmovilización de células se puede llevar a cabo usando una amplia variedad de soportes sólidos compuestos de materiales naturales y/o sintéticos.

La recuperación de los catalizadores perhidrolasa deseados de una fermentación discontinua, fermentación semicontinua o cultivo continuo, se puede llevar a cabo por cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la técnica. Por ejemplo, cuando el catalizador enzimático se produce de forma intracelular, la pasta de células se separa del medio de cultivo por centrifugación o filtración con membrana, opcionalmente se lava con agua o un tampón acuoso a un pH deseado, después se homogeneiza una suspensión de la pasta de células en un tampón acuoso a un pH deseado para producir un extracto de células que contiene el catalizador enzimático deseado. El extracto celular opcionalmente se puede filtrar a través de un adyuvante de filtración adecuado tal como celite o sílice para separar los desechos celulares antes de una etapa de tratamiento térmico para precipitar la proteína no deseada de la disolución de catalizador enzimático. Después, la disolución que contiene el catalizador enzimático deseado se puede separar de los desechos celulares y proteína precipitados por filtración con membrana o centrifugación, y concentrar la disolución de catalizador enzimático parcialmente purificada resultante por filtración adicional con membrana, después mezclar opcionalmente con un vehículo adecuado (por ejemplo, maltodextrina, tampón de fosfato, tampón de citrato, o sus mezclas) y secar por atomización para producir un polvo sólido que comprende el catalizador enzimático deseado.

Cuando una cantidad, concentración u otro valor o parámetro se da como un intervalo, intervalo preferido, o una lista de valores superiores preferidos y valores inferiores preferidos, esto debe entenderse como que describe específicamente todos los intervalos formados desde cualquier par de límite superior de intervalo o valor preferido y cualquier límite inferior de intervalo o valor preferido, independientemente de que los intervalos se describan por separado. Cuando se cita en la presente memoria un intervalo de valores numéricos, salvo que se exponga otra cosa, se pretende que el intervalo incluya sus extremos y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo. No se pretende que el alcance esté limitado a valores específicos citados cuando se define un intervalo.

Métodos generales

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar realizaciones preferidas. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los autores de la invención para funcionar bien en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria, y por lo tanto se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Todos los reactivos y materiales se obtuvieron de DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD), TCI America (Portland, OR), Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN) o Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO), salvo que se especifique otra cosa.

Las siguientes abreviaturas en la memoria descriptiva corresponden a unidades de medición, técnicas, propiedades o compuestos como sigue: "s" significa segundo(s), "min" significa minuto(s), "h" significa hora(s), "μl" significa microlitro(s), "ml" significa mililitro(s), "l" significa litro(s), "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimol(es), "ppm" significa parte(s) por millón, "p" significa peso, "% en peso" significa porcentaje en peso, "g" significa gramo(s), "mg" significa miligramo(s), "μg" significa microgramo(s), "ng" significa nanogramo(s), "g" significa gravedad, "HPLC" significa cromatografía de líquidos de alto rendimiento, "H₂O dd" significa agua destilada y desionizada, "dcw" peso de células secas, "ATCC" o "ATCC®" significa la American Type Culture Collection (Manassas, VA), "U" significa unidad(es) de actividad de perhidrolasa, "rpm" significa revolución(es) por minuto, "Tg" significa temperatura de transición vítrea y "EDTA" significa ácido etilendiaminotetraacético.

Ejemplo 1

Construcción de una cepa de *E. coli* alterada por catalasa *katG*

La región codificante del gen de resistencia a la kanamicina (*kan*; SEQ ID NO: 26) se amplificó a partir del plásmido pKD13 (SEQ ID NO: 27) por PCR (0,5 min a 94°C, 0,5 min a 55°C, 1 min a 70°C, 30 ciclos) usando los cebadores identificados como SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 para generar el producto de la PCR identificado como SEQ ID NO: 30. La secuencia del ácido nucleico de *katG* se proporciona como SEQ ID NO: 31 y la correspondiente secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 32. *E. coli* MG1655 (ATCC® 47076™) se transformó con el plásmido sensible a la temperatura pKD46 (SEQ ID NO: 33), que contiene los genes de la recombinasa A-Red (Datsenko y Wanner, (2000), PNAS USA 97:6640-6645), y se seleccionó en placas de LB-amp durante 24 h a 30°C. MG1655/pKD46 se transformó con 50-500 ng del producto de la PCR por electroporación (BioRad Gene Pulser, cubeta de 0,2 cm, 2,5 kV, 200 W, 25 μF), y se seleccionó en placas de LB-kan durante 24 h a 37°C. Varias colonias se aplicaron en rayas sobre las placas de LB-kan y se incubaron durante la noche a 42°C para curar el plásmido pKD46. Se comprobaron las colonias para confirmar un fenotipo de kanR/ampS. Se aisló el ADN genómico de varias colonias usando el sistema de purificación de ADN PUREGENE® (Gentra Systems, Minneapolis, MN), y se comprobó por PCR para confirmar la alteración del gen *katG* usando los cebadores identificados como SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35. Varias cepas alteradas por *katG* se transformaron con el plásmido sensible a la temperatura pCP20 (SEQ ID NO: 36), que contiene la recombinasa FLP, usada para escindir el gen *kan*, y se seleccionaron en placas de LB-amp durante 24 h a 37°C. Varias colonias se aplicaron en rayas sobre las placas de LB y se incubaron durante la noche a 42°C para curar el plásmido pCP20. Se comprobaron dos colonias para confirmar un fenotipo de kanS/ampS, y se llamaron MG1655 KatG1 y MG1655 KatG2.

Ejemplo 2

Construcción de una cepa de *E. coli* alterada por catalasa *katE*

El gen de resistencia a la kanamicina (SEQ ID NO: 26) se amplificó a partir del plásmido pKD13 (SEQ ID NO: 27) por PCR (0,5 min a 94°C, 0,5 min a 55°C, 1 min a 70°C, 30 ciclos) usando los cebadores identificados como SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 para generar el producto de la PCR identificado como SEQ ID NO: 39. La secuencia del ácido nucleico de *katE* se proporciona como SEQ ID NO: 40 y la correspondiente secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 41. *E. coli* MG1655 (ATCC® 47076™) se transformó con el plásmido sensible a la temperatura pKD46 (SEQ ID NO: 33), que contiene los genes de la recombinasa A-Red, y se seleccionó en placas de LB-amp durante 24 h a 30°C. MG1655/pKD46 se transformó con 50-500 ng del producto de la PCR por electroporación (BioRad Gene Pulser, cubeta de 0,2 cm, 2,5 kV, 200 W, 25 μF), y se seleccionó en placas de LB-kan durante 24 h a 37°C. Varias colonias se aplicaron en rayas sobre las placas de LB-kan y se incubaron durante la noche a 42°C para curar el plásmido pKD46. Se comprobaron las colonias para confirmar un fenotipo de kanR/ampS. Se aisló el ADN genómico de varias colonias usando el sistema de purificación de ADN PUREGENE®, y se comprobó por PCR para confirmar la alteración del gen *katE* usando los cebadores identificados como SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. Varias cepas alteradas por *katE* se transformaron con el plásmido sensible a la temperatura pCP20 (SEQ ID NO: 36), que contiene la recombinasa FLP, usada para escindir el gen *kan*, y se seleccionaron en placas de LB-amp durante 24 h a 37°C. Varias colonias se aplicaron en rayas sobre las placas de LB y se incubaron durante la noche a 42°C para curar el plásmido pCP20. Se comprobaron dos colonias para confirmar un fenotipo de kanS/ampS, y se llamaron MG1655 KatE1 y MG1655 KatE2.

Ejemplo 3

Construcción de una cepa de *E. coli* alterada por catalasa *katG* y catalasa *katE* (KLP18)

El gen de resistencia a la kanamicina (SEQ ID NO: 26) se amplificó a partir del plásmido pKD13 (SEQ ID NO: 27) por PCR (0,5 min a 94°C, 0,5 min a 55°C, 1 min a 70°C, 30 ciclos) usando los cebadores identificados como SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 para generar el producto de la PCR identificado como SEQ ID NO: 39. *E. coli* MG1655 KatG1 (Ejemplo 1) se transformó con el plásmido sensible a la temperatura pKD46 (SEQ ID NO: 33), que contiene los genes de la recombinasa A-Red, y se seleccionó en placas de LB-amp durante 24 h a 30°C. MG1655 KatG1/pKD46 se transformó con 50-500 ng del producto de la PCR por electroporación (BioRad Gene Pulser, cubeta de 0,2 cm, 2,5 kV, 200 W, 25 µF), y se seleccionó en placas de LB-kan durante 24 h a 37°C. Varias colonias se aplicaron en rayas sobre las placas de LB-kan y se incubaron durante la noche a 42°C para curar el plásmido pKD46. Se comprobaron las colonias para confirmar un fenotipo de kanR/ampS. Se aisló el ADN genómico de varias colonias usando el sistema de purificación de ADN PUREGENE®, y se comprobó por PCR para confirmar la alteración del gen *katE* usando los cebadores identificados como SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. Varias cepas alteradas por *katE* ($\Delta katE$) se transformaron con el plásmido sensible a la temperatura pCP20 (SEQ ID NO: 36), que contiene la recombinasa FLP, usada para escindir el gen *kan*, y se seleccionaron en placas de LB-amp durante 24 h a 37°C. Varias colonias se aplicaron en rayas sobre las placas de LB y se incubaron durante la noche a 42°C para curar el plásmido pCP20. Se comprobaron dos colonias para confirmar un fenotipo de kanS/ampS, y se llamaron MG1655 KatG1KatE18.1 y MG1655 KatG1KatE23. MG1655 KatG1KatE18.1 se denomina *E. coli* KLP18.

Ejemplo 4

20 Clonación y expresión de perhidrolasa de *Thermotoga neapolitana*

La región codificante del gen que codifica la acetil xilan esterasa de *Thermotoga neapolitana* como se describe en GENBANK® (número de acceso AE000512; región 80481-81458; SEQ ID NO: 44) se sintetizó usando codones optimizados para la expresión en *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA). La región codificante del gen posteriormente se amplificó por PCR (0,5 min a 94°C, 0,5 min a 55°C, 1 min a 70°C, 30 ciclos) usando cebadores identificados como SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46. El producto de ácido nucleico resultante (SEQ ID NO: 47) se subclonó en pTrcHis2-TOPO® para generar el plásmido identificado como pSW196. El plásmido pSW196 se usó para transformar *E. coli* KLP18 (Ejemplo 3) para generar la cepa KLP18/pSW196. KLP18/pSW196 se cultivó en medio LB a 37°C con agitación hasta OD_{600nm} = 0,4-0,5, momento en el que se añadió IPTG hasta una concentración final 1 mM, y se continuó la incubación durante 2-3 h. Las células se recogieron por centrifugación y se llevó a cabo el análisis por SDS-PAGE para confirmar la expresión de la perhidrolasa en 20-40% de la proteína soluble total.

Ejemplo 5

Clonación y expresión de perhidrolasa de *Thermotoga maritima* MSB8

La región codificante del gen que codifica la acetil xilan esterasa de *Thermotoga maritima* MSB8 como se describe en GENBANK® (nº de acceso NP_227893.1; SEQ ID NO: 48) se sintetizó (DNA 2.0, Menlo Park, CA). La región codificante del gen posteriormente se amplificó por PCR (0,5 min a 94°C, 0,5 min a 55°C, 1 min a 70°C, 30 ciclos) usando cebadores identificados como SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50. El producto de ácido nucleico resultante (SEQ ID NO: 51) se cortó con las enzimas de restricción PstI y XbaI se subclonó entre los sitios PstI y XbaI en pUC19 para generar el plásmido identificado como pSW207. El plásmido pSW207 se usó para transformar *E. coli* KLP18 (Ejemplo 3) para generar la cepa KLP18/pSW207. KLP18/pSW207 se cultivó en medio LB a 37°C con agitación hasta OD_{600nm} = 0,4-0,5, momento en el que se añadió IPTG hasta una concentración final 1 mM, y se continuó la incubación durante 2-3 h. Las células se recogieron por centrifugación y se llevó a cabo el análisis por SDS-PAGE para confirmar la expresión de la enzima perhidrolasa en 20-40% de la proteína soluble total.

Ejemplo 6

Fermentación de transformantes de *E. coli* KLP18 que expresan perhidrolasa

45 Se preparó un cultivo de siembra en fermentador cargando un matraz de agitación de 2 litros con 0,5 l de medio de siembra que contenía extracto de levadura (Amberex 695, 5,0 g/l), K₂HPO₄ (10,0 g/l), KH₂PO₄ (7,0 g/l), citrato de sodio dihidrato (1,0 g/l), (NH₄)₂SO₄ (4,0 g/l), MgSO₄ heptahidrato (1,0 g/l) y citrato férrico amónico (0,10 g/l). El pH del medio se ajustó a 6,8 y el medio se esterilizó en el matraz. Las adiciones posteriores a la esterilización incluían glucosa (50% en peso, 10,0 ml) y 1 ml de disolución madre de ampicilina (25 mg/ml). Se inoculó en el medio de siembra un 1 ml de cultivo de *E. coli* KLP18/pSW196 o *E. coli* KLP18/pSW207 en glicerol al 20% y se cultivó a 35°C y 300 rpm. El cultivo de siembra se transfirió a aproximadamente OD_{550nm} 1-2 a un fermentador de 14 litros (Braun Biotech, Allentown, PA) con 8 litros de medio a 35°C que contenía KH₂PO₄ (3,50 g/l), FeSO₄ heptahidrato (0,05 g/l), MgSO₄ heptahidrato (2,0 g/l), citrato de sodio dihidrato (1,90 g/l), extracto de levadura (Amberex 695, 5,0 g/l), antiespumante Biospumex153K (0,25 ml/l, Cognis Corporation, Monheim, Alemania), NaCl (1,0 g/l), CaCl₂ dihidrato (10 g/l), y disolución de oligoelementos NIT (10 ml/l). La disolución de oligoelementos contenía ácido cítrico monohidrato (10 g/l), MnSO₄ hidrato (2 g/l), NaCl (2 g/l), FeSO₄ heptahidrato (0,5 g/l), ZnSO₄ heptahidrato (0,2 g/l), CuSO₄ pentahidrato (0,02 g/l) y NaMoO₄ dihidrato (0,02 g/l). Las adiciones posteriores a la esterilización incluían

5 disolución de glucosa (50% en peso, 80,0 g) y disolución madre (16,00 ml) de ampicilina (25 mg/ml). La disolución de glucosa (50% en p/p) se usó para cultivo semicontinuo. La alimentación de glucosa se iniciaba cuando la concentración de glucosa disminuía a 0,5 g/l, empezando a 0,31 g de alimentación/min y aumentando progresivamente cada hora a 0,36, 0,42, 0,49, 0,57, 0,66, 0,77, 0,90, 1,04, 1,21, 1,41 y 1,63 g/min respectivamente; después la velocidad permanecía constante. Se vigiló la concentración de glucosa en el medio y si la concentración superaba 0,1 g/l la velocidad de alimentación se disminuía o se detenía temporalmente. La inducción se inició entre OD_{550nm} = 56 y OD_{550nm} = 80 con adición de 16 ml de IPTG (0,5 M) para las diferentes cepas. La concentración de oxígeno disuelto (DO) se controló al 25% de saturación de aire. El DO se controló primero mediante la velocidad de agitación del rotor (400 a 1400 rpm) y después por la velocidad de aireación (2 a 10 slpm). El pH se controló a 6,8. Se usaron NH₄OH (29% en p/p) y H₂SO₄ (20% en p/v) para el control de pH. La presión de descarga era 0,5 bar. Las células se recogieron por centrifugación 16 h después de la adición de IPTG.

Ejemplo 7

Preparación de extractos celulares tratados por calor de esterasas/perhidrolasas CE-7

15 Se preparó un extracto celular de un transformante de *E. coli* que expresaba perhidrolasa de *Thermotoga neapolitana* (KLP18/pSW196) o de *Thermotoga maritima* MSB8 (KLP18/pSW207), pasando una suspensión de la pasta celular (20% en peso, de peso de células húmedas) en tampón de fosfato potásico 0,05 M (pH 7,0) que contenía ditiotreitól (1 mM) dos veces a través de una prensa de French que tenía una presión de trabajo de -110 MPa (16.000 psi). Después el extracto bruto se centrifugó a 20.000 x g para separar los desechos celulares, produciendo un extracto de células clarificado en el que se analizó la proteína soluble total (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich nº de catálogo BCA1-KT). El extracto clarificado que contenía perhidrolasa de *Thermotoga maritima* MSB8 o *Thermotoga neapolitana* se calentó durante 20 min a 75°C, seguido inmediatamente de enfriamiento en un baño de hielo/agua a 5°C. La mezcla resultante se centrifugó para separar la proteína precipitada y el líquido sobrenadante se recogió y se analizó la proteína soluble total como antes. El análisis por SDS-PAGE del líquido sobrenadante tratado con calor indicaba que la perhidrolasa constituía al menos aproximadamente 90% de la proteína soluble total presente en el líquido sobrenadante.

Ejemplo 8

Estabilidad frente a la temperatura de polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/trehalosa

30 Se preparó un conjunto de diez muestras acuosas que contenían concentraciones variables de la proteína del extracto celular tratado con calor de *E. coli* KLP18/pSW196 (≥ 90% de perhidrolasa de *T. neapolitana* por PAGE), trehalosa (Cargill), y opcionalmente polisorbato 80 (p80) como tensioactivo en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH = 8,1) (Tabla 1). Estas disoluciones se secaron por atomización usando un secador por atomización de cámara de vidrio Büchi B-290 (temperatura de entrada = 170°C, temperatura de salida = 90°C, velocidad de alimentación = 3 ml/min a 10 ml/min) para producir diez polvos de enzimas secados por atomización; el porcentaje en peso de proteína en los polvos se determinó usando el ensayo de proteínas de BCA (ácido bicinónico), y las temperaturas de transición vítrea (Tg) de estos polvos se midieron usando calorimetría diferencial de barrido (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de disoluciones de proteína/excipientes usados para producir polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/trehalosa, y Tg de los polvos correspondientes.

Disolución de proteína/excipientes	trehalosa (g/l)	proteína (g/l)	excipientes/proteína	p80 (g/l)	polvo de proteína/excipientes	% en peso de proteína en el polvo de proteína/excipientes	Tg del polvo de proteína/excipientes (°C)
S1-1	52,5	35	1,5	0,25	P1-2	39,2	42
S2-1	100	50	2,0	0	P2-2	32,5	48
S3-1	100	50	2,0	0,50	P3-2	33,2	40
S4-1	50	50	1,0	0	P4-2	45,1	40
S5-1	50	50	1,0	0,50	P5-2	46,7	54
S6-1	40	20	2,0	0	P6-2	31,4	44
S7-1	40	20	2,0	0,50	P7-2	32,5	45
S8-1	20	20	1,0	0	P8-2	47,8	38
S9-1	20	20	1,0	0,50	P9-2	46,6	58
S10-1	52,5	35	1,5	0,25	P10-2	37,8	21

Los polvos de enzima secados por atomización se almacenaron en viales cerrados herméticamente a 40°C y se tomaron muestras a intervalos de una semana, y se analizó en las muestras la concentración de ácido peracético producido en 5 minutos en reacciones que contenían perhidrolasa de *T. neapolitana* (50 µg proteína/ml), H₂O₂ (100 mM), triacetina (100 mM) y TURPINAL® SL (500 ppm) en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 7,2) a 25°C, y se analizó la producción de ácido peracético usando una modificación del método analítico descrito por Karst et al. (más abajo).

Se retiró una muestra (0,040 ml) de la mezcla de reacción en un tiempo predeterminado (5 min) y se mezcló inmediatamente con 0,960 ml de ácido fosfórico 5 mM en agua para terminar la reacción ajustando el pH de la muestra diluida a menos de pH 4. La disolución resultante se filtró usando una unidad de filtro ULTRAFREE® MC (límite de peso molecular nominal 30.000 (NMWL), Millipore Corp., Billerica, MA; n° cat. UFC3LKT 00) por centrifugación durante 2 min a 12.000 rpm. Una parte alícuota (0,100 ml) del filtrado resultante se transfirió a un vial de HPLC con tapón de rosca de 1,5 ml (Agilent Technologies, Palo Alto, CA; n° 5182-0715) que contenía 0,300 ml de agua desionizada, después se añadieron 0,100 ml de MTS 20 mM (sulfuro de metilo y p-tolilo) en acetonitrilo, el vial se tapó y el contenido se mezcló brevemente antes de una incubación de 10 min a aproximadamente 25°C en ausencia de luz. Después se añadieron al vial 0,400 ml de acetonitrilo y 0,100 ml de una disolución de trifetilfosfina (TEPP, 40 mM) en acetonitrilo, el vial se volvió a tapar, y la disolución resultante se mezcló y se incubó a aproximadamente 25°C durante 30 min en ausencia de luz. Después se añadieron al vial 0,100 ml de N,N-dietil-m-toluamida 10 mM (DEET; referencia externa del HPLC) y en la disolución resultante se analizó por HPLC el MTSO (sulfóxido de metilo y p-tolilo), el producto de oxidación estequiométrico producido por reacción del MTS con ácido peracético. Se realizó una reacción de control en ausencia del extracto de proteína añadido o triacetina para determinar la velocidad de oxidación del MTS en la mezcla de ensayo por peróxido de hidrógeno, para la corrección de la velocidad de producción de ácido peracético respecto a la oxidación del MTS de fondo. Método de HPLC: Columna Supelco Discovery C8 (10 cm X 4,0 mm, 5 µm) (n° cat. 569422-U) con precolumna de Supelco Supelguard Discovery C8 (Sigma-Aldrich; n° cat 59590-U); volumen de inyección 10 microlitros; método de gradiente con CH₃CN (Sigma-Aldrich; n° de catálogo 270717) y agua desionizada a 1,0 ml/min y temperatura ambiente.

Tabla 2. Gradiente de HPLC para el análisis de ácido peracético.

Tiempo (min:s)	(% CH ₃ CN)
0:00	40
3:00	40
3:10	100
4:00	100
4:10	40
7:00 (detención)	40

La actividad perhidrolítica del polvo secado por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/trehalosa era estable a lo largo de ocho semanas de almacenamiento a 40°C (Tabla 3).

Tabla 3. Estabilidad frente a la temperatura de los polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/trehalosa durante el almacenamiento a 40°C. PAA (ppm) producido en 5 min a 25°C por reacción de triacetina (100 mM) y H₂O₂ (100 mM) en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 7,2) que contenía polvo secado por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/trehalosa (50 µg de proteína/ml) y TURPINAL® SL (500 ppm).

Tiempo a 40°C	PAA (ppm) en 5 minutos									
	P1-2	P2-2	P3-2	P4-2	P5-2	P6-2	P7-2	P8-2	P9-2	P10-2
inicial	1855	1983	2075	2025	1769	1891	1902	1777	1880	1945
semana 1	1872	2019	2060	1785	1776	1887	2013	1903	2046	2204
semana 2	1830	1899	1870	1771	1833	1930	1987	1933	2146	2222
semana 3	1888	1974	1887	1973	1977	2223	2102	1924	2080	2104
semana 4	1894	1878	2035	1881	1712	1918	1902	1793	1720	1988
semana 5	1595	1744	1706	1565	1871	2052	1933	1783	1908	1985
semana 6	1908	1760	1538	1545	1825	1864	1756	1675	1659	1758
semana 7	1562	1797	1614	1487	1551	1774	1879	1927	1866	1957
semana 8	1881	1959	1792	1753	1939	2123	1972	1907	1902	2095

Ejemplo 9

Estabilidad frente a la temperatura de polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/trehalosa en una mezcla de polvo de enzima y triacetina

5 Los polvos de enzima secados por atomización preparados como se describe en el ejemplo 8 se evaluaron respecto a la estabilidad cuando se almacenaban durante ocho semanas a 40°C como una mezcla del polvo seco por atomización en triacetina. Los polvos de enzima secados por atomización se añadieron a la triacetina para producir una mezcla que contenía 0,200 g de proteína en 87,2 g de triacetina. Las mezclas resultantes se almacenaron a 40°C, y se ensayaron 2,19 g de muestra de la mezcla bien agitada semanalmente a 25°C en una reacción de 100 ml que contenía peróxido de hidrógeno 100 mM y TURPINAL® SL (500 ppm) en tampón de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 7,2, donde la concentración resultante de triacetina y proteína era 100 mM y 50 µg/ml, respectivamente. La comparación de los datos en la tabla 4 con los datos en el ejemplo 8, tabla 3, demuestran la inestabilidad de los polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/trehalosa cuando se almacenan como una mezcla con triacetina.

15 Tabla 4. Estabilidad frente a la temperatura de los polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/trehalosa durante el almacenamiento en una mezcla de polvo de enzima y triacetina a 40°C. PAA (ppm) producido en 5 min a 25°C por reacción de triacetina (100 mM) y H₂O₂ (100 mM) en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 7,2) que contenía perhidrolasa de *T. neapolitana* (50 µg de proteína/ml) y TURPINAL® SL (500 ppm).

Tiempo a 40°C	PAA (ppm) en 5 minutos									
	P1-2	P2-2	P3-2	P4-2	P5-2	P6-2	P7-2	P8-2	P9-2	P10-2
inicial	165	149	1539	156	166	1735	1552	1327	1712	1816
semana 1	1214	1359	1597	1599	1589	1632	1515	1469	1421	1577
semana 2	1303	1609	1580	1316	1293	1682	1353	971	1402	1483
semana 3	1092	1573	1568	1233	1293	1245	1268	849	1324	1388
semana 4	828	1563	1420	1226	1199	1608	1361	961	1172	1273
semana 5	622	1340	1114	1294	1154	1663	1163	739	815	667
semana 6	636	1301	990	970	895	1318	514	313	699	372
semana 7	281	998	1140	841	798	962	259	188	831	521
semana 8	254	569	659	563	567	483	414	323	494	321

Ejemplo 10

20 Estabilidad frente a la temperatura del polvo de enzima seco por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/maltodextrina

25 Se preparó una mezcla acuosa que contenía proteína de extracto celular tratado con calor de *E. coli* KLP18/pSW196 (34 g proteína/l ≥ 90% de perhidrolasa de *T. neapolitana* por PAGE) y maltodextrina (maltodextrina 66,7 g/l de MALTRIN® M100, 14,7 g/l de MALTRIN® M250, 14,7 g/l de MALTRIN® M040, Grain Processing Corporation, Muscatine, IA) como excipiente en bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,1). Esta disolución se secó por atomización usando un secador por atomización (GEA Niro, 91,4 cm (3 ft) de diámetro, temperatura de entrada = 226 °C, temperatura de salida = 76 °C, velocidad de alimentación = 60 g/min) para producir un polvo de enzima seco por atomización; el porcentaje en peso de proteína en el polvo (20,3% en peso) se determinó usando el ensayo de proteínas de BCA (ácido bicinonínico), y la temperatura de transición vítrea de este polvo (T_g = 54 °C) se midió usando calorimetría diferencial de barrido modulada. Esta disolución se secó por atomización para producir un polvo que después se ensayó para determinar la estabilidad durante el almacenamiento a 40°C durante 9 semanas. Se tomaron muestras del polvo de enzima seco por atomización (almacenado a 40°C) en intervalos de una semana, y se determinó la actividad usando 50 µg de proteína/ml de perhidrolasa de *T. neapolitana*, H₂O₂ (100 mM), triacetina (100 mM) y TURPINAL® SL (500 ppm) en tampón de bicarbonato 50 mM (pH 7,2) a 25°C, y se analizó la producción de ácido peracético usando una modificación del método analítico descrito por Karst et al., véase antes. La actividad perhidrolítica del polvo seco por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/maltodextrina era estable a lo largo de ocho semanas de almacenamiento a 40°C (Tabla 5).

Tabla 5. Estabilidad frente a la temperatura de los polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/maltodextrina durante el almacenamiento a 40°C. PAA (ppm) producido en 5 min a 25°C por reacción de triacetina (100 mM) y H₂O₂ (100 mM) en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 7,2) que contenía perhidrolasa de *T. neapolitana* (50 µg de proteína/ml) y TURPINAL® SL (500 ppm).

Tiempo a 40°C	PAA (ppm) en 5 min
inicial	1142
semana 1	1117
semana 2	1135
semana 3	1087
semana 4	964
semana 5	1153
semana 6	930
semana 7	1025
semana 8	964

5 Ejemplo 11

Estabilidad frente a la temperatura de polvo de enzima secado por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/maltodextrina almacenado en una mezcla de polvo de enzima y triacetina

El polvo de enzima secado por atomización preparado como se describe en el ejemplo 10 se evaluó respecto a la estabilidad cuando se almacenaba durante veintiuna semanas a 40°C como una mezcla del polvo secado por atomización en triacetina. El polvo de enzima secado por atomización (1,235, 20,3% en peso de proteína) se añadió a 109 g de triacetina. La mezcla resultante se almacenó a 40°C, y se ensayó una muestra de 2,19 g de la mezcla bien agitada por duplicado a 25°C en una reacción de 100 ml que contenía peróxido de hidrógeno (100 mM) y TURPINAL® SL (500 ppm) en tampón de bicarbonato de sodio 50 mM a pH 7,2, donde la concentración resultante de triacetina y proteína era 100 mM y 50 µg/ml, respectivamente. La comparación de los datos en la tabla 6 con los datos en el ejemplo 10, tabla 5, demuestran la estabilidad de los polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/maltodextrina cuando se almacenaban como una mezcla con triacetina.

Tabla 6. Estabilidad frente a la temperatura del polvo de enzima secado por atomización de perhidrolasa de *T. neapolitana*/maltodextrina durante el almacenamiento en una mezcla de polvo de enzima y triacetina a 40°C. PAA (ppm) producido en 5 min a 25°C por reacción de triacetina (100 mM) y H₂O₂ (100 mM) en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 7,2) que contenía perhidrolasa de *T. neapolitana* (50 µg de proteína/ml) y TURPINAL® SL (500 ppm).

Tiempo a 40°C	PAA (ppm) en 5 min		
	duplicado A	duplicado B	Media
inicial	1010	1019	1015
semana 1	983	1054	1019
semana 2	897	927	912
semana 3	1194	1137	1166
semana 4	1139	1088	1114
semana 5	1099	1069	1084
semana 6	1098	978	1038
semana 7	1018	1006	1012
semana 8	907	892	900
semana 12	925	936	931
semana 18	824	ND	
semana 21	792	ND	

ND = no se hizo un ensayo duplicado

Ejemplo 12

Estabilidad frente a la temperatura del polvo de enzima secado por atomización de perhidrolasa de *T. maritima*/maltodextrina

Se preparó una mezcla acuosa que contenía proteína de extracto celular tratado con calor de *E. coli* KLP18/pSW207 (aprox. 21 g proteína/l \geq 90% de perhidrolasa de *T. maritima* por PAGE) y maltodextrina (maltodextrina 31 g/l de DE 13-17 y maltodextrina 31 g/l de DE 4-7, Aldrich) como excipiente en bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,1). Esta disolución se secó por atomización usando un secador por atomización de cámara de vidrio Buchi B-290 (temperatura de entrada = 170°C, temperatura de salida = 90°C, velocidad de alimentación = 4,5 ml/min) para producir un polvo de enzima secado por atomización; el porcentaje en peso de proteína en el polvo (18,0% en peso) se determinó usando el ensayo de proteínas de BCA (ácido biconínico), y la temperatura de transición vítrea de este polvo ($T_g = 90^\circ\text{C}$) se midió usando calorimetría diferencial de barrido modulada. Después se ensayó la estabilidad de este polvo durante el almacenamiento a 40°C durante 7 semanas. Se tomaron muestras del polvo de enzima secado por atomización (almacenado a 40°C) en intervalos de una semana, y se determinó la actividad por adición de 50 μg de proteína/ml de perhidrolasa de *T. maritima* a la mezcla de reacción que contenía H_2O_2 (100 mM), triacetina (100 mM) y TURPINAL® SL (500 ppm) en tampón de bicarbonato 50 mM (pH 7,2) a 25°C, y se analizó la producción de ácido peracético usando una modificación del método analítico descrito por Karst et al. La actividad perhidrolítica del polvo secado por atomización de perhidrolasa de *T. maritima*/maltodextrina era estable a lo largo de siete semanas de almacenamiento a 40°C (Tabla 7).

Tabla 7. Estabilidad frente a la temperatura del polvo de enzima secado por atomización de perhidrolasa de *T. maritima*/maltodextrina durante el almacenamiento a 40°C. PAA (ppm) producido en 5 min a 25°C por reacción de triacetina (100 mM) y H_2O_2 (100 mM) en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 7,2) que contenía perhidrolasa de *T. maritima* (50 μg de proteína/ml) y TURPINAL® SL (500 ppm).

Tiempo a 40°C	PAA (ppm) en 5 min
inicial	1373
semana 1	1262
semana 2	1548
semana 3	1317
semana 4	1316
semana 5	1378
semana 6	1296
semana 7	1475

Ejemplo 13

Estabilidad frente a la temperatura de polvo de enzima secado por atomización de perhidrolasa de *T. maritima*/maltodextrina almacenado en una mezcla de polvo de enzima y triacetina

El polvo de enzima secado por atomización preparado como se describe en el ejemplo 12 se evaluó respecto a la estabilidad cuando se almacenaba durante siete semanas a 40°C como una mezcla del polvo secado por atomización en triacetina. El polvo de enzima secado por atomización (0,556, 18,0% en peso de proteína) se añadió a 43,6 g de triacetina. La mezcla resultante se almacenó a 40°C, y se ensayó una muestra de 2,21 g de la mezcla bien agitada por duplicado a 25°C en una reacción de 100 ml que contenía peróxido de hidrógeno (100 mM) y TURPINAL® SL (500 ppm) en tampón de bicarbonato de sodio 50 mM a pH 7,2, donde las concentraciones resultantes de triacetina y proteína eran 100 mM y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. La comparación de los datos en la tabla 8 con los datos en el ejemplo 12, tabla 7, demuestran la estabilidad de los polvos de enzima secados por atomización de perhidrolasa de *T. maritima*/maltodextrina cuando se almacenaban como una mezcla con triacetina.

Tabla 8. Estabilidad frente a la temperatura del polvo de enzima secado por atomización de perhidrolasa de *T. maritima*/maltodextrina durante el almacenamiento en una mezcla de polvo de enzima y triacetina a 40°C. PAA (ppm) producido en 5 min a 25°C por reacción de triacetina (100 mM) y H_2O_2 (100 mM) en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 7,2) que contenía perhidrolasa de *T. maritima* (50 μg de proteína/ml) y TURPINAL® SL (500 ppm).

Tiempo a 40°C	PAA (ppm) en 5 min
inicial	1137
semana 1	1089
semana 2	1138
semana 3	1213

Tiempo a 40°C	PAA (ppm) en 5 min
semana 4	1130
semana 5	872
semana 6	858
semana 7	1004

Ejemplo 14 Perhidrólisis de diacetato de propilenglicol o diacetato de etilenglicol usando perhidrolasa de *Bacillus subtilis* ATCC® 31954™

Se preparó un homogeneizado de un transformante que expresaba la perhidrolasa de tipo natural de *Bacillus subtilis* ATCC® 31954™ (KLP18/pSW194) a partir de una suspensión de pasta celular (20% en peso de peso de células húmedas) en tampón de fosfato de potasio 0,05 M (pH 7,0) que contenía ditioneitol (1 mM). El homogeneizado bruto se centrifugó para separar los desechos celulares, produciendo un extracto celular clarificado que se trató con calor a 65°C durante 30 min. La mezcla resultante se centrifugó, y el líquido sobrenadante tratado con calor se concentró en una membrana con MWCO (corte de exclusión por peso molecular) de 30K hasta una concentración de 32 mg/ml de sólidos totales disueltos; un análisis por SDS-PAGE del extracto celular tratado con calor, clarificado indicaba que la perhidrolasa era al menos 85-90% pura. Después se añadieron a este concentrado 2,06 gramos de NaH₂PO₄ y se añadieron 1,17 g de Na₂HPO₄ por gramo de sólidos a este concentrado para producir una relación aproximada 3:1 (p/p) de tampón de fosfato a proteína de extracto celular tratado con calor. Esta disolución se diluyó al 30% en peso con agua desionizada, después se secó por atomización (temperatura de entrada 180°C, temperatura de salida 70°C) usando un secador por atomización de laboratorio Buchi B-290; el polvo secado por atomización resultante contenía 25,5% en peso de proteína (ensayo de proteína de Bradford) y 94,3% en peso de sólidos secos.

Las reacciones (10 ml de volumen total) se llevaron a cabo a 23°C en un tampón de bicarbonato de sodio 50 mM (inicial pH 7,2) que contenía diacetato de propilenglicol (PGDA) o diacetato de etilenglicol (EGDA), peróxido de hidrógeno (100 mM) y 123 µg/ml de una proteína de extracto tratado con calor de *E. coli* KLP18/pSW194 secada por atomización (que expresaba la perhidrolasa de tipo natural de *Bacillus subtilis* ATCC® 31954™) (preparada como se ha descrito antes). Se llevó a cabo una reacción de control para cada una de las condiciones de reacción para determinar la concentración de ácido peracético producido por perhidrólisis química de la triacetina por peróxido de hidrógeno en ausencia de la proteína del extracto tratado con calor añadido. Se tomaron muestras de las reacciones a los 1, 5 y 30 minutos y se analizó el ácido peracético de las muestras usando el protocolo de derivatización de Karst (Karst et al., véase antes); se retiraron partes alícuotas (0,040 ml) de la mezcla de reacción y se mezclaron con 0,960 ml de ácido fosfórico 5 mM en agua; el ajuste del pH de la muestra diluida a menos de pH 4 terminó inmediatamente la reacción. La disolución resultante se filtró usando una unidad de filtro ULTRAFREE® MC (límite de peso molecular nominal 30.000 (NMWL), Millipore n° cat. UFC3LKT 00) por centrifugación durante 2 min a 12.000 rpm. Una parte alícuota (0,100 ml) del filtrado resultante se transfirió a un vial de HPLC con tapón de rosca de 1,5 ml (Agilent Technologies, Palo Alto, CA; n° 5182-0715) que contenía 0,300 ml de agua desionizada, después se añadieron 0,100 ml de MTS 20 mM (sulfuro de metilo y p-tolilo) en acetonitrilo, los viales se taparon y el contenido se mezcló brevemente antes de una incubación de 10 min a aproximadamente 25°C en ausencia de luz. Después se añadieron a cada vial 0,400 ml de acetonitrilo y 0,100 ml de una disolución de trifenílfosfina (TPP, 40 mM) en acetonitrilo, los viales se volvieron a tapar, y la disolución resultante se mezcló y se incubó a aproximadamente 25°C durante 30 min en ausencia de luz. Después se añadieron a cada vial 0,100 ml de N,N-dietil-m-toluamida 10 mM (DEET; referencia externa del HPLC) y la disolución resultante se analizó por HPLC. Las concentraciones de ácido peracético producidas en 1 min, 5 min y 30 min se dan en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentración de ácido peracético (PAA) producida en reacciones que usan diacetato de propilenglicol (PGDA) o diacetato de etilenglicol (EGDA) y peróxido de hidrógeno (100 mM) en tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, inicial pH 7,2) a 23°C usando 123 µg/ml de proteína de extracto tratado con calor de *E. coli* KLP18/pSW194 (perhidrolasa de *Bacillus subtilis* ATCC® 31954™).

perhidrolasa (50 µg/ml)	sustrato (100 mM)	PAA, 1 min (ppm)	PAA, 5 min (ppm)	PAA, 30 min (ppm)
sin enzima (control)	PGDA	0	64	241
<i>B. subtilis</i> ATCC® 31954	PGDA	666	781	815
sin enzima (control)	EGDA	0	18	141
<i>B. subtilis</i> ATCC® 31954	EGDA	747	931	963

Ejemplo 15

Perhidrólisis de diacetato de propilenglicol o diacetato de etilenglicol usando perhidrolasas de tipo natural y variantes de *T. maritima* y *T. neapolitana*

Extractos de células de transformantes que expresan perhidrolasa de tipo natural de *Thermotoga neapolitana* (KLP18/pSW196), perhidrolasa variante de *Thermotoga neapolitana* C277S (KLP18/pSW196/C277S), perhidrolasa

variante de *Thermotoga neapolitana* C277T (KLP18/pSW196/C277T), perhidrolasa de tipo natural de *Thermotoga maritima* (KLP18/pSW228), perhidrolasa variante de *Thermotoga maritima* C277S (KLP18/pSW228/C277S), y perhidrolasa variante de *Thermotoga maritima* C277T (KLP18/pSW228/C277T) se prepararon cada uno pasando una suspensión de pasta celular (20% en peso, de peso de células húmedas) en tampón de fosfato potásico 0,05 M (pH 7,0) que contenía ditioneitol (1 mM) dos veces a través de una prensa de French que tenía una presión de trabajo de -110 MPa (16.000 psi). Las células lisadas se centrifugaron durante 30 minutos a 12.000 x g, produciendo un extracto de células clarificado en el que se analizó la proteína soluble total (ensayo de Bradford). El líquido sobrenadante se calentó a 75°C durante 20 minutos, seguido de inactivación en un baño de hielo durante 2 minutos. La proteína precipitada se separó por centrifugación durante 10 min a 11.000 x g. El análisis por SDS-PAGE del líquido sobrenadante de proteína del extracto tratado con calor resultante, indicaba que la enzima CE-7 comprendía aproximadamente 85-90% de la proteína total en la preparación. El líquido sobrenadante de proteína del extracto tratado con calor se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Se llevó a cabo un primer conjunto de reacciones (10 ml de volumen total) a 20°C en tampón de bicarbonato de sodio 10 mM (pH inicial 8,1) que contenía diacetato de propilenglicol (PGDA) o diacetato de etilenglicol (EGDA) (100 mM), peróxido de hidrógeno (100 mM) y 25 µg/ml de una proteína de extracto tratado con calor de una de *E. coli* KLP18/pSW196 (perhidrolasa de tipo natural de *Thermotoga neapolitana*), *E. coli* KLP18/pSW196/C277S (perhidrolasa variante de *Thermotoga neapolitana* C277S), *E. coli* KLP18/pSW196/C277T (perhidrolasa variante de *Thermotoga neapolitana* C277T), *E. coli* KLP18/pSW228 (perhidrolasa de tipo natural de *Thermotoga maritima*), *E. coli* KLP18/pSW228/C277S (perhidrolasa variante de *Thermotoga maritima* C277S), y *E. coli* KLP18/pSW228/C277T (perhidrolasa variante de *Thermotoga maritima* C277T) (preparados como se ha descrito antes). Se llevó a cabo una reacción de control para cada una de las condiciones de reacción para determinar la concentración de ácido peracético producido por perhidrólisis química de la triacetina por peróxido de hidrógeno en ausencia de la proteína del extracto añadida. Se tomaron muestras de las reacciones a los 1, 5 y 30 minutos y se analizó el ácido peracético de las muestras usando el protocolo de derivatización de Karst (Karst et al., véase antes) y el método analítico de HPLC (véase antes). Las concentraciones de ácido peracético producidas en 1 min, 5 min y 30 min se dan en la Tabla 10.

Tabla 10: Concentración de ácido peracético (PAA) producida usando perhidrolasas de tipo natural y variantes de *T. maritima* y *T. neapolitana* en reacciones a 20°C en tampón de bicarbonato de sodio (10 mM, pH inicial 8,1) que contenían diacetato de propilenglicol (PGDA) (100 mM) o diacetato de etilenglicol (EGDA) (100 mM), peróxido de hidrógeno (100 mM) y 25 µg/ml de proteína de extracto tratado con calor.

perhidrolasa	sustrato	Conc. de sustrato (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	PAA, 1 min (ppm)	PAA, 5 min (ppm)	PAA, 30 min (ppm)
sin enzima (control)	PGDA	100	100	0	15	165
<i>T. maritima</i> WT	PGDA	100	100	534	1104	1695
<i>T. maritima</i> C277S	PGDA	100	100	647	1320	1864
<i>T. maritima</i> C277T	PGDA	100	100	656	1174	1418
<i>T. neapolitana</i> WT	PGDA	100	100	513	1052	1946
<i>T. neapolitana</i> C277S	PGDA	100	100	875	1327	1707
<i>T. neapolitana</i> C277T	PGDA	100	100	724	1325	1864
sin enzima (control)	EGDA	100	100	0	70	229
<i>T. maritima</i> WT	EGDA	100	100	765	1182	1595
<i>T. maritima</i> C277S	EGDA	100	100	725	1240	1724
<i>T. maritima</i> C277T	EGDA	100	100	802	1218	1734
<i>T. neapolitana</i> WT	EGDA	100	100	603	1132	1643
<i>T. neapolitana</i> C277S	EGDA	100	100	680	1305	1698
<i>T. neapolitana</i> C277T	EGDA	100	100	688	1164	1261

Se llevó a cabo un segundo conjunto de reacciones (10 ml de volumen total) a 20°C en tampón de bicarbonato de sodio 10 mM (pH inicial 8,1) que contenía diacetato de propilenglicol (PGDA) o diacetato de etilenglicol (EGDA) (2 mM), peróxido de hidrógeno (10 mM) y 10 µg/ml de una proteína de extracto tratado con calor de una de *E. coli* KLP18/pSW196 (perhidrolasa de tipo natural de *Thermotoga neapolitana*), *E. coli* KLP18/pSW196/C277S (perhidrolasa variante de *Thermotoga neapolitana* C277S), *E. coli* KLP18/pSW196/C277T (perhidrolasa variante de *Thermotoga neapolitana* C277T), *E. coli* KLP18/pSW228 (perhidrolasa de tipo natural de *Thermotoga maritima*), *E. coli* KLP18/pSW228/C277S (perhidrolasa variante de *Thermotoga maritima* C277S), y *E. coli* KLP18/pSW228/C277T (perhidrolasa variante de *Thermotoga maritima* C277T) (preparados como se ha descrito antes). Se llevó a cabo una reacción de control para cada una de las condiciones de reacción para determinar la concentración de ácido peracético producido por perhidrólisis química de la triacetina por peróxido de hidrógeno en ausencia de la proteína

del extracto añadida. Se tomaron muestras de las reacciones a los 5 minutos y se analizó el ácido peracético de las muestras usando el protocolo de derivatización de Karst (Karst et al., véase antes) y el método analítico de HPLC (véase antes). Las concentraciones de ácido peracético producidas en 5 min se dan en la Tabla 11.

5 Tabla 11: Concentración de ácido peracético (PAA) producida usando perhidrolasas de tipo natural y variantes de *T. maritima* y *T. neapolitana* en reacciones a 20°C en tampón de bicarbonato de sodio (10 mM, pH inicial 8,1) que contenían diacetato de propilenglicol (PGDA) (2 mM) o diacetato de etilenglicol (EGDA) (2 mM), peróxido de hidrogeno (10 mM) y 10 µg/ml de proteína de extracto tratado con calor.

perhidrolasa	sustrato	Conc. de sustrato (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	PAA, 5 min (ppm)
sin enzima (control)	PGDA	2	10	3.6
<i>T. maritima</i> WT	PGDA	2	10	5.0
<i>T. maritima</i> C277S	PGDA	2	10	7.2
<i>T. maritima</i> C277T	PGDA	2	10	7.9
<i>T. neapolitana</i> WT	PGDA	2	10	5.7
<i>T. neapolitana</i> C277S	PGDA	2	10	7.9
<i>T. neapolitana</i> C277T	PGDA	2	10	3.9
sin enzima (control)	EGDA	2	10	3.3
<i>T. maritima</i> WT	EGDA	2	10	9.9
<i>T. maritima</i> C277S	EGDA	2	10	13.6
<i>T. maritima</i> C277T	EGDA	2	10	22.9
<i>T. neapolitana</i> WT	EGDA	2	10	6.6
<i>T. neapolitana</i> C277S	EGDA	2	10	18.4
<i>T. neapolitana</i> C277T	EGDA	2	10	20.2

Listado de secuencias

- 10 <110> E.I. du Pont de Nemours and Company
DiCosimo, Robert
Ben-Bassat, Arie
Payne, Mark
Zolandz, Raymond
- <120> Estabilización de perhidrolasas
- 15 <130> CL4386 US NA
- <150> US 61/102.512
<151> 03-10-2008
- <150> US 61/102.505
<151> 03-10-2008
- 20 <150> US 61/102.514
<151> 03-10-2008
- <150> US 61/102.520
<151> 03-10-2008
- 25 <150> US 61/102.531
<151> 03-10-2008
- <150> US 61/102.539
<151> 03-10-2008
- <160> 51
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
<211> 318
<212> PRT

ES 2 735 230 T3

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro
1 5 10 15

Glu Lys Thr Ala Pro Lys Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Leu Ser Leu
20 25 30

Glu Glu Leu Ala Lys Val Gln Ala Glu Pro Asp Leu Gln Pro Val Asp
35 40 45

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

Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Gln Gly
65 70 75 80

Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp
85 90 95

ES 2 735 230 T3

Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Ala
 100 105 110

Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile
 115 120 125

Ser Leu His Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp
 130 135 140

Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala
 145 150 155 160

Leu Glu Val Ile Ser Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly
 165 170 175

Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala
 180 185 190

Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser
 195 200 205

Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu
 210 215 220

Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln
 225 230 235 240

Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg
 245 250 255

Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr
 260 265 270

Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys
 275 280 285

Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe
 290 295 300

Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly
 305 310 315

<210> 2
 <211> 318
 <212> PRT
 5 <213> Bacillus subtilis

<400> 2

Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro
 1 5 10 15

ES 2 735 230 T3

Glu Lys Thr Thr Pro Asn Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Ser Ser Leu
 20 25 30
 Asp Glu Leu Ala Lys Val Lys Ala Ala Pro Asp Leu Gln Leu Val Asp
 35 40 45
 Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Lys Ser Phe
 50 55 60
 Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Glu Gly
 65 70 75 80
 Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp
 85 90 95
 Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Ala
 100 105 110
 Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile
 115 120 125
 Ser Pro His Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp
 130 135 140
 Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala
 145 150 155 160
 Leu Glu Val Ile Ser Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly
 165 170 175
 Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala
 180 185 190
 Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser
 195 200 205
 Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu
 210 215 220
 Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Glu Lys
 225 230 235 240
 Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg
 245 250 255
 Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr
 260 265 270

ES 2 735 230 T3

Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys
 275 280 285

Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe
 290 295 300

Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly
 305 310 315

<210> 3

<211> 318

<212> PRT

5 <213> Bacillus licheniformis

<400> 3

Met Gln Gln Pro Tyr Asp Met Pro Leu Glu Gln Leu Tyr Gln Tyr Lys
 1 5 10 15

Pro Glu Arg Thr Ala Pro Ala Asp Phe Lys Glu Phe Trp Lys Gly Ser
 20 25 30

Leu Glu Glu Leu Ala Asn Glu Lys Ala Gly Pro Gln Leu Glu Pro His
 35 40 45

Glu Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Trp Leu Thr Tyr Arg Ser
 50 55 60

Ile Gly Gly Ala Arg Ile Lys Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Arg Gln
 65 70 75 80

Gly Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr
 85 90 95

Asp Gly Asp Ile His Asp Ile Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala
 100 105 110

Ala Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Asn Ser Ser Glu Asp Thr Glu
 115 120 125

Ile Ser His His Gly His Val Pro Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu
 130 135 140

Asp Pro Lys Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg
 145 150 155 160

Ala Val Glu Val Val Ser Gly Phe Ala Glu Val Asp Glu Lys Arg Ile
 165 170 175

Gly Val Ile Gly Ala Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ala Val Ala Val Ser

ES 2 735 230 T3

180

185

190

Ala Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ser Glu Tyr Pro Tyr Leu
195 200 205

Ser Asn Phe Gln Arg Ala Ile Asp Thr Ala Ile Asp Gln Pro Tyr Leu
210 215 220

Glu Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Thr Ser Pro Asp Ile Glu Gln
225 230 235 240

Ala Ala Met His Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Val Met Asn Leu Ala Gln
245 250 255

Leu Val Lys Ala Thr Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Val Asp Thr Ile
260 265 270

Thr Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Asp
275 280 285

Lys Glu Ile Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Pro
290 295 300

Phe Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Leu Arg Lys His Leu Lys
305 310 315

<210> 4

<211> 320

<212> PRT

5 <213> Bacillus pumilus

<400> 4

Met Gln Leu Phe Asp Leu Ser Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Lys Pro
1 5 10 15

Lys Lys Thr Ala Arg Pro Asp Phe Ser Asp Phe Trp Lys Lys Ser Leu
20 25 30

Glu Glu Leu Arg Gln Val Glu Ala Glu Pro Thr Leu Glu Ser Tyr Asp
35 40 45

Tyr Pro Val Lys Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Gln Ser Phe
50 55 60

Gly His Ser Lys Ile Glu Gly Phe Tyr Ala Val Pro Asp Gln Thr Gly
65 70 75 80

Pro His Pro Ala Leu Val Arg Phe His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp
85 90 95

ES 2 735 230 T3

Gly Gly Ile His Asp Ile Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Thr
 100 105 110

Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gly Gly Ser Glu Asp Thr Ser Val
 115 120 125

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

Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala
 145 150 155 160

Leu Glu Val Ile Gln Ser Phe Pro Glu Val Asp Glu His Arg Ile Gly
 165 170 175

Val Ile Gly Gly Ser Gln Gly Gly Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ala Ala
 180 185 190

Leu Ser Asp Ile Pro Lys Val Val Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser
 195 200 205

Asn Phe Glu Arg Ala Val Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu
 210 215 220

Ile Asn Ser Tyr Phe Arg Arg Asn Ser Asp Pro Lys Val Glu Glu Lys
 225 230 235 240

Ala Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Leu Ala Gly Trp
 245 250 255

Val Lys Gln Pro Thr Leu Met Ala Ile Gly Leu Ile Asp Lys Ile Thr
 260 265 270

Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Asp Lys
 275 280 285

Asp Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Phe Ile Pro Ala Phe
 290 295 300

Gln Thr Glu Lys Leu Ser Phe Leu Gln Lys His Leu Leu Leu Ser Thr
 305 310 315 320

<210> 5

<211> 320

<212> PRT

5 <213> Clostridium thermocellum

<400> 5

Met Ala Gln Leu Tyr Asp Met Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Lys

ES 2 735 230 T3

1		5						10						15	
Pro	Ala	Leu	Thr	Lys	Gln	Lys	Asp	Phe	Asp	Glu	Phe	Trp	Glu	Lys	Ser
		20						25					30		
Leu	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu	Ile	Pro	Leu	Lys	Tyr	Gln	Leu	Ile	Pro	Tyr
		35					40					45			
Asp	Phe	Pro	Ala	Arg	Arg	Val	Lys	Val	Phe	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Gly
	50					55					60				
Phe	Lys	Gly	Ala	Asn	Ile	Glu	Gly	Trp	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Gly	Glu
65					70					75					80
Gly	Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Phe	His	Gly	Tyr	Asn	Trp	Ala	Met
				85					90					95	
Asp	Gly	Cys	Val	Pro	Asp	Val	Val	Asn	Trp	Ala	Leu	Asn	Gly	Tyr	Ala
			100					105					110		
Ala	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Arg	Gly	Gln	Gln	Gly	Arg	Ser	Val	Asp	Asn
		115					120					125			
Ile	Val	Pro	Gly	Ser	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Trp	Met	Ser	Lys	Gly	Ile
	130					135					140				
Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Val	Tyr	Met	Asp	Ala	Val
145					150					155					160
Arg	Ala	Val	Glu	Ile	Leu	Ala	Ser	Leu	Pro	Cys	Val	Asp	Glu	Ser	Arg
				165					170					175	
Ile	Gly	Val	Thr	Gly	Gly	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Val
			180					185					190		
Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Ile	Pro	Lys	Val	Ala	Ala	Val	His	Tyr	Pro	Phe
		195					200					205			
Leu	Ala	His	Phe	Glu	Arg	Ala	Ile	Asp	Val	Ala	Pro	Asp	Gly	Pro	Tyr
	210					215					220				
Leu	Glu	Ile	Asn	Glu	Tyr	Leu	Arg	Arg	Asn	Ser	Gly	Glu	Glu	Ile	Glu
225					230					235					240
Arg	Gln	Val	Lys	Lys	Thr	Leu	Ser	Tyr	Phe	Asp	Ile	Met	Asn	Leu	Ala
				245					250					255	
Pro	Arg	Ile	Lys	Cys	Arg	Thr	Trp	Ile	Cys	Thr	Gly	Leu	Val	Asp	Glu
			260					265					270		

ES 2 735 230 T3

Ile Thr Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Val Tyr Asn His Leu Lys Cys
 275 280 285

Pro Lys Glu Ile Ser Val Phe Arg Tyr Phe Gly His Glu His Met Pro
 290 295 300

Gly Ser Val Glu Ile Lys Leu Arg Ile Leu Met Asp Glu Leu Asn Pro
 305 310 315 320

<210> 6

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Thermotoga neapolitana

<400> 6

Met Ala Phe Phe Asp Met Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
 1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Arg Glu Thr Leu
 20 25 30

Lys Glu Ser Glu Gly Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Lys Val Asp
 35 40 45

Phe His Leu Lys Thr Val Glu Thr Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
 50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
 85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
 100 105 110

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Met Lys Gly Asp
 115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Gly Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
 130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Gly Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
 145 150 155 160

Phe Val Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ile Ser Phe Pro Arg
 165 170 175

ES 2 735 230 T3

Val Asp Ser Arg Lys Val Val Val Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Asn Arg Val Lys Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Val Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
245 250 255

Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Val Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
260 265 270

Met Asp Thr Ile Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His
275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Ile Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Arg
305 310 315 320

Leu Phe Glu Glu Gly
325

<210> 7

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Thermotoga maritima

<400> 7

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Glu Thr Leu
20 25 30

Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
35 40 45

Ser His Leu Lys Thr Val Glu Ala Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
65 70 75 80

ES 2 735 230 T3

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

<210> 8
 <211> 320

ES 2 735 230 T3

<212> PRT

<213> Thermoanaerobacterium sp.

<400> 8

Met Gly Leu Phe Asp Met Pro Leu Gln Lys Leu Arg Glu Tyr Thr Gly
 1 5 10 15

Thr Asn Pro Cys Pro Glu Asp Phe Asp Glu Tyr Trp Asn Arg Ala Leu
 20 25 30

Asp Glu Met Arg Ser Val Asp Pro Lys Ile Glu Leu Lys Glu Ser Ser
 35 40 45

Phe Gln Val Ser Phe Ala Glu Cys Tyr Asp Leu Tyr Phe Thr Gly Val
 50 55 60

Arg Gly Ala Arg Ile His Ala Lys Tyr Ile Lys Pro Lys Thr Glu Gly
 65 70 75 80

Lys His Pro Ala Leu Ile Arg Phe His Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Gly
 85 90 95

Asp Trp Asn Asp Lys Leu Asn Tyr Val Ala Ala Gly Phe Thr Val Val
 100 105 110

Ala Met Asp Val Arg Gly Gln Gly Gly Gln Ser Gln Asp Val Gly Gly
 115 120 125

Val Thr Gly Asn Thr Leu Asn Gly His Ile Ile Arg Gly Leu Asp Asp
 130 135 140

Asp Ala Asp Asn Met Leu Phe Arg His Ile Phe Leu Asp Thr Ala Gln
 145 150 155 160

Leu Ala Gly Ile Val Met Asn Met Pro Glu Val Asp Glu Asp Arg Val
 165 170 175

Gly Val Met Gly Pro Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Leu Ala Cys Ala
 180 185 190

Ala Leu Glu Pro Arg Val Arg Lys Val Val Ser Glu Tyr Pro Phe Leu
 195 200 205

Ser Asp Tyr Lys Arg Val Trp Asp Leu Asp Leu Ala Lys Asn Ala Tyr
 210 215 220

Gln Glu Ile Thr Asp Tyr Phe Arg Leu Phe Asp Pro Arg His Glu Arg

ES 2 735 230 T3

Asp Pro Asp Gln Tyr Tyr Tyr Ser Leu Val Tyr Met Asp Cys Phe Arg
145 150 155 160

Ser Ile Asp Ala Val Arg Glu Leu Ser Arg Lys Arg Ser Val Phe Val
165 170 175

Glu Gly Gly Ser Gln Gly Gly Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ala Ala Leu
180 185 190

Gln Asp Asp Ile Leu Leu Ala Leu Ala Asp Ile Pro Phe Leu Thr His
195 200 205

Phe Lys Arg Ser Val Glu Leu Ser Ser Asp Gly Pro Tyr Gln Glu Ile
210 215 220

Ser His Tyr Phe Lys Val His Asp Pro Leu His Gln Thr Glu Glu Gln
225 230 235 240

Val Tyr Gln Thr Leu Ser Tyr Val Asp Cys Met Asn Met Ala Ser Met
245 250 255

Val Glu Cys Pro Val Leu Leu Ser Ala Gly Leu Glu Asp Ile Val Cys
260 265 270

Pro Pro Ser Ser Ala Phe Ala Leu Phe Asn His Leu Gly Gly Pro Lys
275 280 285

Glu Ile Arg Ala Tyr Pro Glu Tyr Ala His Glu Val Pro Ala Val His
290 295 300

Glu Glu Glu Lys Leu Lys Phe Ile Ser Ser Arg Leu Lys Asn Arg Glu
305 310 315 320

Lys Arg Cys Arg Pro
325

<210> 10
<211> 319
<212> PRT
5 <213> Bacillus halodurans

<400> 10

Met Pro Leu Ile Asp Met Pro Leu Thr Glu Leu Lys Glu Tyr Met Gly
1 5 10 15

Arg Asn Pro Lys Pro Asp Asp Phe Thr Glu Tyr Trp Asp Arg Ala Leu
20 25 30

Gln Glu Met Arg Lys Val Asn Pro Asn Val Glu Leu Ile Pro Ser Asp

ES 2 735 230 T3

Leu Pro Gly His Arg Asp Arg Ile Phe Gln Phe Leu Ser Asp Leu
 305 310 315

<210> 11
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Bacillus clausii

5

<400> 11

Met Pro Leu Val Asp Met Pro Leu Arg Glu Leu Leu Ala Tyr Glu Gly
 1 5 10 15

Ile Asn Pro Lys Pro Ala Asp Phe Asp Gln Tyr Trp Asn Arg Ala Lys
 20 25 30

Thr Glu Ile Glu Ala Ile Asp Pro Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Ser
 35 40 45

Phe Gln Cys Ser Phe Ala Asn Cys Tyr His Phe Tyr Tyr Arg Ser Ala
 50 55 60

Gly Asn Ala Lys Ile His Ala Lys Tyr Val Gln Pro Lys Ala Gly Glu
 65 70 75 80

Lys Thr Pro Ala Val Phe Met Phe His Gly Tyr Gly Gly Arg Ser Ala
 85 90 95

Glu Trp Ser Ser Leu Leu Asn Tyr Val Ala Ala Gly Phe Ser Val Phe
 100 105 110

Tyr Met Asp Val Arg Gly Gln Gly Gly Thr Ser Glu Asp Pro Gly Gly
 115 120 125

Val Arg Gly Asn Thr Tyr Arg Gly His Ile Ile Arg Gly Leu Asp Ala
 130 135 140

Gly Pro Asp Ala Leu Phe Tyr Arg Ser Val Phe Leu Asp Thr Val Gln
 145 150 155 160

Leu Val Arg Ala Ala Lys Thr Leu Pro His Ile Asp Lys Thr Arg Leu
 165 170 175

Met Ala Thr Gly Trp Ser Gln Gly Gly Ala Leu Thr Leu Ala Cys Ala
 180 185 190

Ala Leu Val Pro Glu Ile Lys Arg Leu Ala Pro Val Tyr Pro Phe Leu
 195 200 205

ES 2 735 230 T3

Ser Asp Tyr Lys Arg Val Trp Gln Met Asp Leu Ala Val Arg Ser Tyr
 210 215 220

Lys Glu Leu Ala Asp Tyr Phe Arg Ser Tyr Asp Pro Gln His Lys Arg
 225 230 235 240

His Gly Glu Ile Phe Glu Arg Leu Gly Tyr Ile Asp Val Gln His Leu
 245 250 255

Ala Asp Arg Ile Gln Gly Asp Val Leu Met Gly Val Gly Leu Met Asp
 260 265 270

Thr Glu Cys Pro Pro Ser Thr Gln Phe Ala Ala Tyr Asn Lys Ile Lys
 275 280 285

Ala Lys Lys Ser Tyr Glu Leu Tyr Pro Asp Phe Gly His Glu His Leu
 290 295 300

Pro Gly Met Asn Asp His Ile Phe Arg Phe Phe Thr Ser
 305 310 315

<210> 12

<211> 318

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 12

Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro
 1 5 10 15

Glu Lys Thr Ala Pro Lys Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Leu Ser Leu
 20 25 30

Glu Glu Leu Ala Lys Val Gln Ala Glu Pro Asp Leu Gln Pro Val Asp
 35 40 45

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

Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Gln Gly
 65 70 75 80

Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp
 85 90 95

Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Ala
 100 105 110

Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile
 115 120 125

ES 2 735 230 T3

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

Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala
 145 150 155 160

Leu Glu Val Ile Ser Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly
 165 170 175

Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala
 180 185 190

Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser
 195 200 205

Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu
 210 215 220

Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln
 225 230 235 240

Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg
 245 250 255

Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr
 260 265 270

Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys
 275 280 285

Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe
 290 295 300

Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly
 305 310 315

<210> 13
 <211> 320
 <212> PRT

5 <213> Thermoanaerobacterium saccharolyticum

<400> 13

Met Gly Leu Phe Asp Met Pro Leu Gln Lys Leu Arg Glu Tyr Thr Gly
 1 5 10 15

Thr Asn Pro Cys Pro Glu Asp Phe Asp Glu Tyr Trp Asp Arg Ala Leu
 20 25 30

ES 2 735 230 T3

Asp Glu Met Arg Ser Val Asp Pro Lys Ile Lys Met Lys Lys Ser Ser
 35 40 45
 Phe Gln Val Pro Phe Ala Glu Cys Tyr Asp Leu Tyr Phe Thr Gly Val
 50 55 60
 Arg Gly Ala Arg Ile His Ala Lys Tyr Ile Arg Pro Lys Thr Glu Gly
 65 70 75 80
 Lys His Pro Ala Leu Ile Arg Phe His Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Gly
 85 90 95
 Asp Trp Asn Asp Lys Leu Asn Tyr Val Ala Ala Gly Phe Thr Val Val
 100 105 110
 Ala Met Asp Ala Arg Gly Gln Gly Gly Gln Ser Gln Asp Val Gly Gly
 115 120 125
 Val Asn Gly Asn Thr Leu Asn Gly His Ile Ile Arg Gly Leu Asp Asp
 130 135 140
 Asp Ala Asp Asn Met Leu Phe Arg His Ile Phe Leu Asp Thr Ala Gln
 145 150 155 160
 Leu Ala Gly Ile Val Met Asn Met Pro Glu Ile Asp Glu Asp Arg Val
 165 170 175
 Ala Val Met Gly Pro Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Leu Ala Cys Ala
 180 185 190
 Ala Leu Glu Pro Lys Ile Arg Lys Val Val Ser Glu Tyr Pro Phe Leu
 195 200 205
 Ser Asp Tyr Lys Arg Val Trp Asp Leu Asp Leu Ala Lys Asn Ala Tyr
 210 215 220
 Gln Glu Ile Thr Asp Tyr Phe Arg Leu Phe Asp Pro Arg His Glu Arg
 225 230 235 240
 Glu Asn Glu Val Phe Thr Lys Leu Gly Tyr Ile Asp Val Lys Asn Leu
 245 250 255
 Ala Lys Arg Ile Lys Gly Asp Val Leu Met Cys Val Gly Leu Met Asp
 260 265 270
 Gln Val Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Asn Ile Gln
 275 280 285
 Ser Lys Lys Asp Ile Lys Val Tyr Pro Asp Tyr Gly His Glu Pro Met

ES 2 735 230 T3

290

295

300

Arg Gly Phe Gly Asp Leu Ala Met Gln Phe Met Leu Glu Leu Tyr Ser
305 310 315 320

<210> 14

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Thermotoga lettingae

<400> 14

Met Val Tyr Phe Asp Met Pro Leu Glu Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Asp Phe Trp Lys Gln Thr Ile
20 25 30

His Glu Thr Arg Gly Tyr Phe Gln Glu Pro Ile Leu Lys Lys Val Asp
35 40 45

Phe Tyr Leu Gln Asn Val Glu Thr Phe Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50 55 60

Arg Gly Gln Lys Ile Lys Gly Trp Leu Ile Leu Pro Lys Phe Arg Asn
65 70 75 80

Gly Lys Leu Pro Cys Val Val Glu Phe Val Gly Tyr Gly Gly Arg
85 90 95

Gly Phe Pro Tyr Asp Trp Leu Leu Trp Ser Ala Ala Gly Tyr Ala His
100 105 110

Phe Ile Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Asn Trp Met Lys Gly Asp
115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Glu Asp Asn Pro Ser Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
130 135 140

Leu Thr Lys Gly Val Leu Asn Pro Glu Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
145 150 155 160

Phe Met Asp Ala Phe Met Ala Val Glu Thr Ile Ser Gln Leu Glu Gln
165 170 175

Ile Asp Ser Gln Thr Ile Ile Leu Ser Gly Ala Ser Gln Gly Gly Gly
180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Ser Lys Val Met Ala Leu Leu
195 200 205

ES 2 735 230 T3

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Tyr Lys Arg Ala Val Gln Ile Thr
 210 215 220

Asp Ser Met Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Arg Tyr Cys Lys Thr His Ile
 225 230 235 240

Asp Lys Ile Gln Thr Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
 245 250 255

Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Cys Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
 260 265 270

Met Asp Asp Ile Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Tyr
 275 280 285

Tyr Ala Gly Glu Lys Asp Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
 290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe His Thr Leu Glu Lys Leu Lys Phe Val Lys Lys
 305 310 315 320

Thr Ile Ser Met Arg Glu
 325

<210> 15

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Thermotoga petrophila

<400> 15

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
 1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Gly Thr Leu
 20 25 30

Ala Glu Asn Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
 35 40 45

Ser His Leu Lys Thr Val Glu Ala Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
 50 55 60

Met Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
 65 70 75 80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
 85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys

ES 2 735 230 T3

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Lys Glu Thr Leu
20 25 30

Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
35 40 45

Ser His Leu Lys Thr Val Glu Val Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
65 70 75 80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
100 105 110

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Leu Lys Gly Asp
115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Asp Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Arg
165 170 175

Val Asp His Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
245 250 255

ES 2 735 230 T3

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

Met Asp Asn Ile Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His
 275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
 290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Ile Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Arg
 305 310 315 320

Leu Phe Glu Lys Gly
 325

<210> 17

<211> 279

<212> PRT

5 <213> Thermotoga sp.

<400> 17

Met Ala Leu Phe Asp Met Pro Leu Glu Lys Leu Arg Ser Tyr Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Arg Tyr Glu Glu Glu Asp Phe Asp Leu Phe Trp Lys Glu Thr Leu
 20 25 30

Glu Glu Ser Arg Lys Phe Pro Leu Asp Pro Ile Phe Glu Arg Val Asp
 35 40 45

Tyr Leu Leu Glu Asn Val Glu Val Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
 50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Ala Trp Leu Ile Leu Pro Val Val Lys Lys
 65 70 75 80

Glu Glu Arg Leu Pro Cys Ile Val Glu Phe Ile Gly Tyr Arg Gly Gly
 85 90 95

Arg Gly Phe Pro Phe Asp Trp Leu Phe Trp Ser Ser Ala Gly Tyr Ala
 100 105 110

His Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Thr Ser Arg Val Lys Gly
 115 120 125

Asp Thr Pro Asp Tyr Cys Asp Glu Pro Ile Asn Pro Gln Phe Pro Gly
 130 135 140

Phe Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg
 145 150 155 160

ES 2 735 230 T3

Val Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Thr Ala Ser Ser Phe Pro
 165 170 175

Gly Ile Asp Pro Glu Arg Ile Ala Val Val Gly Thr Ser Gln Gly Gly
 180 185 190

Gly Ile Ala Leu Ala Val Ala Ala Leu Ser Glu Ile Pro Lys Ala Leu
 195 200 205

Val Ser Asn Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Ile
 210 215 220

Thr Asp Asn Ala Pro Tyr Ser Glu Ile Val Asn Tyr Leu Lys Val His
 225 230 235 240

Arg Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly
 245 250 255

Val Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Ile Pro Ala Leu Phe Ser Val Ala
 260 265 270

Leu Met Asp Lys Thr Cys Pro
 275

- <210> 18
- <211> 182
- <212> PRT
- <213> Bacillus subtilis

5

<400> 18

Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile Ser Leu His Gly His
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp Lys Asp Thr Tyr Tyr
 20 25 30

Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala Leu Glu Val Ile Ser
 35 40 45

Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly Val Thr Gly Gly Ser
 50 55 60

Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala Leu Ser Asp Ile Pro
 65 70 75 80

Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser Asn Phe Glu Arg Ala
 85 90 95

ES 2 735 230 T3

Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu Ile Asn Ser Phe Phe
 100 105 110

Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln Ala Met Lys Thr Leu
 115 120 125

Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg Val Lys Val Pro Val
 130 135 140

Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr Pro Pro Ser Thr Val
 145 150 155 160

Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys Glu Leu Lys Val Tyr
 165 170 175

Arg Tyr Phe Gly His Glu
 180

- <210> 19
- <211> 325
- <212> PRT
- 5 <213> Thermotoga neapolitana

- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_NUEVA
- <222> (277)..(277)
- <223> Xaa es Ala, Val, Ser, o Thr.

10 <400> 19

Met Ala Phe Phe Asp Met Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
 1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Arg Glu Thr Leu
 20 25 30

Lys Glu Ser Glu Gly Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Lys Val Asp
 35 40 45

Phe His Leu Lys Thr Val Glu Thr Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
 50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
 85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
 100 105 110

ES 2 735 230 T3

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Met Lys Gly Asp
 115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Gly Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
 130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Gly Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
 145 150 155 160

Phe Val Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ile Ser Phe Pro Arg
 165 170 175

Val Asp Ser Arg Lys Val Val Val Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
 180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Asn Arg Val Lys Ala Leu Leu
 195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
 210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Val Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
 225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
 245 250 255

Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Val Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
 260 265 270

Met Asp Thr Ile Xaa Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His
 275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
 290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Ile Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Arg
 305 310 315 320

Leu Phe Glu Glu Gly
 325

<210> 20
 <211> 325
 <212> PRT
 5 <213> Thermotoga maritima

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_NUEVA
 <222> (277)..(277)
 <223> Xaa es Ala, Val, Ser, o Thr

10 <400> 20

ES 2 735 230 T3

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Glu Thr Leu
20 25 30

Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
35 40 45

Ser His Leu Lys Thr Val Glu Ala Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
65 70 75 80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
100 105 110

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Leu Lys Gly Asp
115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Gly Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Gln
165 170 175

Val Asp Gln Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val

ES 2 735 230 T3

245

250

255

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

Met Asp Asn Ile Xaa Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Tyr
275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Val Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Lys
305 310 315 320

Leu Phe Glu Lys Gly
325

- <210> 21
- <211> 326
- <212> PRT
- 5 <213> Thermotoga lettingae

- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_NUEVA
- <222> (277)..(277)
- <223> Xaa es Ala, Val, Ser, o Thr.

10 <400> 21

Met Val Tyr Phe Asp Met Pro Leu Glu Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Phe Trp Lys Gln Thr Ile
20 25 30

His Glu Thr Arg Gly Tyr Phe Gln Glu Pro Ile Leu Lys Lys Val Asp
35 40 45

Phe Tyr Leu Gln Asn Val Glu Thr Phe Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50 55 60

Arg Gly Gln Lys Ile Lys Gly Trp Leu Ile Leu Pro Lys Phe Arg Asn
65 70 75 80

Gly Lys Leu Pro Cys Val Val Glu Phe Val Gly Tyr Gly Gly Gly Arg
85 90 95

Gly Phe Pro Tyr Asp Trp Leu Leu Trp Ser Ala Ala Gly Tyr Ala His
100 105 110

Phe Ile Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Asn Trp Met Lys Gly Asp

ES 2 735 230 T3

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

<210> 22

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Thermotoga petrophila

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_NUEVA

<222> (277)..(277)

<223> Xaa es Ala, Val, Ser, o Thr.

10 <400> 22

ES 2 735 230 T3

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Gly Thr Leu
20 25 30

Ala Glu Asn Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
35 40 45

Ser His Leu Lys Thr Val Glu Ala Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50 55 60

Met Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
65 70 75 80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
100 105 110

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Met Lys Gly Asp
115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Asp Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Arg
165 170 175

Val Asp His Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
245 250 255

ES 2 735 230 T3

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

Met Asp Asn Ile Xaa Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His
 275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
 290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Ile Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Arg
 305 310 315 320

Leu Phe Glu Lys Gly
 325

<210> 23
 <211> 325
 <212> PRT
 5 <213> Thermotoga sp.

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_NUEVA
 <222> (277)..(277)
 <223> Xaa es Ala, Val, Ser, o Thr.

10 <400> 23

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
 1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Lys Glu Thr Leu
 20 25 30

Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
 35 40 45

Ser His Leu Lys Thr Val Glu Val Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
 50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
 65 70 75 80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
 85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
 100 105 110

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Leu Lys Gly Asp
 115 120 125

ES 2 735 230 T3

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Asp Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
 130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
 145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Arg
 165 170 175

Val Asp His Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
 180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
 195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
 210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
 225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
 245 250 255

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

Met Asp Asn Ile Xaa Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His
 275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
 290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Ile Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Arg
 305 310 315 320

Leu Phe Glu Lys Gly
 325

<210> 24

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Thermotoga sp.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_NUEVA

<222> (278)..(278)

<223> Xaa es Ala, Val, Ser, o Thr

10 <400> 24

ES 2 735 230 T3

Met Ala Leu Phe Asp Met Pro Leu Glu Lys Leu Arg Ser Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Asp Arg Tyr Glu Glu Glu Asp Phe Asp Leu Phe Trp Lys Glu Thr Leu
20 25 30

Glu Glu Ser Arg Lys Phe Pro Leu Asp Pro Ile Phe Glu Arg Val Asp
35 40 45

Tyr Leu Leu Glu Asn Val Glu Val Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Ala Trp Leu Ile Leu Pro Val Val Lys Lys
65 70 75 80

Glu Glu Arg Leu Pro Cys Ile Val Glu Phe Ile Gly Tyr Arg Gly Gly
85 90 95

Arg Gly Phe Pro Phe Asp Trp Leu Phe Trp Ser Ser Ala Gly Tyr Ala
100 105 110

His Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Thr Ser Arg Val Lys Gly
115 120 125

Asp Thr Pro Asp Tyr Cys Asp Glu Pro Ile Asn Pro Gln Phe Pro Gly
130 135 140

Phe Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg
145 150 155 160

Val Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Thr Ala Ser Ser Phe Pro
165 170 175

Gly Ile Asp Pro Glu Arg Ile Ala Val Val Gly Thr Ser Gln Gly Gly
180 185 190

Gly Ile Ala Leu Ala Val Ala Ala Leu Ser Glu Ile Pro Lys Ala Leu
195 200 205

Val Ser Asn Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Ile
210 215 220

Thr Asp Asn Ala Pro Tyr Ser Glu Ile Val Asn Tyr Leu Lys Val His
225 230 235 240

Arg Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly
245 250 255

ES 2 735 230 T3

Val Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Ile Pro Ala Leu Phe Ser Val Ala
 260 265 270

Leu Met Asp Lys Thr Xaa Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn
 275 280 285

His Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Lys Val Tyr Pro Phe Asn Glu His
 290 295 300

Glu Gly Gly Glu Ser Phe Gln Arg Met Glu Glu Leu Arg Phe Met Lys
 305 310 315 320

Arg Ile Leu Lys Gly Glu Phe Lys Ala
 325

<210> 25

<211> 320

<212> PRT

5 <213> Thermoanaerobacter sp.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_NUEVA

<222> (275)..(275)

<223> Xaa es Ala, Val, Ser, o Thr.

10 <400> 25

Met Gly Leu Phe Asp Met Pro Leu Gln Lys Leu Arg Glu Tyr Thr Gly
 1 5 10 15

Thr Asn Pro Cys Pro Glu Asp Phe Asp Glu Tyr Trp Asn Arg Ala Leu
 20 25 30

Asp Glu Met Arg Ser Val Asp Pro Lys Ile Glu Leu Lys Glu Ser Ser
 35 40 45

Phe Gln Val Ser Phe Ala Glu Cys Tyr Asp Leu Tyr Phe Thr Gly Val
 50 55 60

Arg Gly Ala Arg Ile His Ala Lys Tyr Ile Lys Pro Lys Thr Glu Gly
 65 70 75 80

Lys His Pro Ala Leu Ile Arg Phe His Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Gly
 85 90 95

Asp Trp Asn Asp Lys Leu Asn Tyr Val Ala Ala Gly Phe Thr Val Val
 100 105 110

Ala Met Asp Val Arg Gly Gln Gly Gly Gln Ser Gln Asp Val Gly Gly
 115 120 125

ES 2 735 230 T3

Val Thr Gly Asn Thr Leu Asn Gly His Ile Ile Arg Gly Leu Asp Asp
 130 135 140

Asp Ala Asp Asn Met Leu Phe Arg His Ile Phe Leu Asp Thr Ala Gln
 145 150 155 160

Leu Ala Gly Ile Val Met Asn Met Pro Glu Val Asp Glu Asp Arg Val
 165 170 175

Gly Val Met Gly Pro Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Leu Ala Cys Ala
 180 185 190

Ala Leu Glu Pro Arg Val Arg Lys Val Val Ser Glu Tyr Pro Phe Leu
 195 200 205

Ser Asp Tyr Lys Arg Val Trp Asp Leu Asp Leu Ala Lys Asn Ala Tyr
 210 215 220

Gln Glu Ile Thr Asp Tyr Phe Arg Leu Phe Asp Pro Arg His Glu Arg
 225 230 235 240

Glu Asn Glu Val Phe Thr Lys Leu Gly Tyr Ile Asp Val Lys Asn Leu
 245 250 255

Ala Lys Arg Ile Lys Gly Asp Val Leu Met Cys Val Gly Leu Met Asp
 260 265 270

Gln Val Xaa Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Asn Ile Gln
 275 280 285

Ser Lys Lys Asp Ile Lys Val Tyr Pro Asp Tyr Gly His Glu Pro Met
 290 295 300

Arg Gly Phe Gly Asp Leu Ala Met Gln Phe Met Leu Glu Leu Tyr Ser
 305 310 315 320

<210> 26
 <211> 795
 <212> ADN

5 <213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 26

atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc 60

ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca 120

gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg 180

caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg 240

ctcgacgttg tcaactgaagc ggggaaggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag 300

ES 2 735 230 T3

gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg 360
 cggcgggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc 420
 atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa 480
 gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgcac 540
 ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 600
 ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 660
 atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc 720
 ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt 780
 gacgagttct tctaa 795

- <210> 27
- <211> 3434
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Plásmido pKD13
- <400> 27

agattgcagc attacacgtc ttgagcgatt gtgtaggctg gagctgcttc gaagttccta 60
 tactttctag agaataggaa ctccggaata ggaacttcaa gatcccctta ttagaagaac 120
 tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tcgcaatcgg gagcggcgat accgtaaagc 180
 acgaggaagc ggtcagccca ttcgccgcca agctcttcag caatatcacg ggtagccaac 240
 gctatgtcct gatagcggtc cgccacaccc agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag 300
 cggccatttt ccacatgat attcggcaag caggcatcgc catgggtcac gacgagatcc 360
 tcgccgtcgg gcatgcgcgc cttgagcctg gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga 420
 tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc 480
 tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag ccggatcaag cgtatgcagc 540
 cgccgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag gagcaagggtg agatgacagg 600
 agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc agccagtccc tccccgcttc agtgacaacg 660
 tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg 720
 tcctgcagtt cattcagggc accggacagg tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc 780
 tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca 840
 tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca 900
 atcatgcgaa acgatcctca tcctgtctct tgatcagatc ttgatcccct gcgccatcag 960
 atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac cttaccagag 1020
 ggcgccccag ctggcaattc cggttcgcctt gctgtccata aaaccgcca gtctagctat 1080
 cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcgtt ttcccttgtc 1140

ES 2 735 230 T3

cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgagg actggctttc 1200
 tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgcctgagt gcttgaggca gcgtgagctt 1260
 caaaagcgct ctgaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcgaac tgcaggtcga 1320
 cggatccccg gaattaattc tcatgtttga cagcttatca ctgatcagtg aattaatggc 1380
 gatgacgcat cctcacgata atatccgggt aggcgcaatc actttcgtct ctactccggt 1440
 acaaagcgag gctgggtatt tcccggcctt tctgttatcc gaaatccact gaaagcacag 1500
 cggctggctg aggagataaa taataaacga ggggctgtat gcacaaagca tcttctggtg 1560
 agttaagaac gagtatcgag atggcacata gccttgctca aattggaatc aggtttgtgc 1620
 caataccagt agaaacagac gaagaagcta gctttgcaact ggattgagag gctttgccat 1680
 ggctaattcc catgtcagcc gttaagtgtt cctgtgtcac tgaaaattgc tttgagaggc 1740
 tctaagggct tctcagtgcg ttacatccct ggcttgttgt ccacaaccgt taaaccttaa 1800
 aagctttaa agccttatat attctttttt ttcttataaa acttaaaacc ttagaggcta 1860
 ttttaagttgc tgatttatat taattttatt gttcaaacat gagagcttag tacgtgaaac 1920
 atgagagctt agtacgttag ccatgagagc ttagtacgtt agccatgagg gtttagttcg 1980
 ttaaacaatga gagcttagta cgtaaacaat gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt 2040
 agtacgtact atcaacaggt tgaactgcgg atcttgccgc cgcaaaaatt aaaaatgaag 2100
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat 2160
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 2220
 cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 2280
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 2340
 ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg 2400
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacggtg ttgccattgc 2460
 tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca 2520
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg 2580
 tctccgcatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc 2640
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 2700
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc 2760
 aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 2820
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 2880
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 2940
 aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa ggaataagg gcgacacgga aatggtgaat 3000
 actcactctc ttctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 3060

ES 2 735 230 T3

	cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	3120
	ccgaaaagtg ccacctgcat cgatggcccc ccgatggtag tgtggggtct ccccatgcga	3180
	gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt	3240
	cgttttatct gttgtttgc ggtgaacgct ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg	3300
	gatttgaacg ttgcgaagca acggccccga ggggtggcggg caggacgccc gccataaact	3360
	gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg gcctttttgc gtggccagtg	3420
	ccaagcttgc atgc	3434
	<210> 28	
	<211> 80	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 28	
	atgagcacgt cagacgatat ccataacacc acagccactg gcaaatgccc gttccatcag	60
	gtgtaggctg gagctgcttc	80
10	<210> 29	
	<211> 82	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 29	
	taacagcagg tcgaaacggt cgaggttcat cactttcacc catgccgcca cgaagtcttt	60
	attccgggga tccgtcgacc tg	82
	<210> 30	
	<211> 1424	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> Constructo sintético	
	<400> 30	
	taacagcagg tcgaaacggt cgaggttcat cactttcacc catgccgcca cgaagtcttt	60
	attccgggga tccgtcgacc tgcagttcga agttcctatt ctctagaaag tataggaact	120
	tcagagcgct tttgaagctc acgctgccgc aagcactcag ggcgcaaggg ctgctaaagg	180
	aagcggaaca cgtagaaagc cagtcgcgag aaacggtgct gacccccgat gaatgtcagc	240
	tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcagt	300
	gggcttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg	360
25	ccagctgggg cgcctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc	420

ES 2 735 230 T3

ttgccgccaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga 480
 tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccgc ttgggtggag 540
 aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cgccgtgttc 600
 cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg 660
 aatgaactgc aggacgaggc agcgcgggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc 720
 gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg 780
 ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct 840
 gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg 900
 aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat 960
 ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc 1020
 atgcccgcag gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg 1080
 gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc 1140
 tatcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct 1200
 gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat 1260
 cgccttcttg acgagttctt ctaataaggg gatcttgaag ttctatttcc gaagttccta 1320
 ttctctagaa agtataggaa cttcgaagca gctccagcct acacctgatg gaacgggcat 1380
 ttgccagtgg ctgtgggttt atggatatcg tctgacgtgc tcat 1424

<210> 31
 <211> 2181
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 31
 atgagcacgt cagacgatat ccataacacc acagccactg gcaaatgcc gttccatcag 60
 ggcggtcacg accagagtgc gggggcgggc acaaccactc gcgactgggt gccaaatcaa 120
 cttcgtgttg acctgttaa ccaacattct aatcgttcta acccactggg tgaggacttt 180
 gactaccgca aagaattcag caaattagat tactacggcc tgaaaaaaga tctgaaagcc 240
 ctggtgacag aatctcaacc gtggtggcca gccgactggg gcagttacgc cggctctgttt 300
 attcgtatgg cctggcacgg cgcggggact taccgttcaa tcgatggacg cggtgggcgcg 360
 ggtcgtggtc agcaacgttt tgcaccgctg aactcctggc cggataacgt aagcctcgat 420
 aaagcgcgtc gcctgttgtg gccaatcaaa cagaaatag gtcagaaaat ctctggggcc 480
 gacctgttta tcctcgcggg taacgtggcg ctagaaaact ccggcttccg taccttcggt 540
 tttgggtgcc gtcgtgaaga cgtctgggaa ccggatctgg atgttaactg gggatgatgaa 600
 aaagcctggc tgactcaccg tcatccggaa gcgctggcga aagcaccgct gggtgcaacc 660
 gagatgggtc tgatttacgt taaccgggaa ggcccggatc acagcggcga accgcttct 720

ES 2 735 230 T3

gcggcagcag ctatccgcgc gaccttcggc aacatgggca tgaacgacga agaaaccgtg 780
 gcgctgattg cgggtgggtca tacgctgggt aaaaccacg gtgccgggtcc gacatcaaat 840
 gtaggtcctg atccagaagc tgcaccgatt gaagaacaag gtttaggttg ggcgagcact 900
 tacggcagcg gcgttggcgc agatgccatt acctctggtc tggaagtagt ctggaccag 960
 acggcgaccc agtggagcaa ctatttcttc gagaacctgt tcaagtatga gtgggtacag 1020
 accgcagcc cggctggcgc aatccagttc gaagcggtag acgcaccgga aattatcccg 1080
 gatccgtttg atccgtcgaa gaaacgtaaa cgcacaatgc tggtgaccga cctgacgctg 1140
 cgttttgatc ctgagttcga gaagatctct cgtcgtttcc tcaacgatcc gcaggcgttc 1200
 aacgaagcct ttgccctgtc ctggttcaaa ctgacgcaca gggatatggg gccgaaatct 1260
 cgctacatcg ggccggaagt gccgaaagaa gatctgatct ggcaagatcc gctgccgcag 1320
 ccgatctaca acccgaccga gcaggacatt atcgatctga aattcgcgat tgcggattct 1380
 ggtctgtctg ttagtgagct ggtatcgggt gcctgggcat ctgcttctac cttccgtggt 1440
 ggcgacaaac gcggtgggtc caacgggtgc cgtctggcat taatgccgca gcgcgactgg 1500
 gatgtgaacg ccgcagccgt tcgtgctctg cctgttctgg agaaaatcca gaaagagtct 1560
 ggtaaagcct cgctggcgga tatcatagtg ctggctgggt tggttggtgt tgagaaagcc 1620
 gcaagcgccg caggtttgag cattcatgta ccgtttgcgc cgggtcgcgt tgatgcgcgt 1680
 caggatcaga ctgacattga gatgtttgag ctgctggagc caattgctga cggtttccgt 1740
 aactatcgcg ctctctgga cgtttccacc accgagtca tgcctgatcga caaagcacag 1800
 caactgacgc tgaccgcgcc ggaaatgact gcgctgggtg gcggcatgcg tgtactgggt 1860
 gccaaacttcg atggcagcaa aaacggcgtc ttcactgacc gcggtggcgt attgagcaat 1920
 gacttcttcg tgaacttgct ggatatgcgt tacgagtgga aagcgaccga cgaatcgaaa 1980
 gagctgttcg aaggccgtga ccgtgaaacc ggcaagtga aatttacggc cagccgtgcg 2040
 gatctgggtg ttggttctaa ctccgtcctg cgtgcgggtg cggaagtta cgccagtagc 2100
 gatgccacg agaagtttgt taaagacttc gtggcggcat gggtgaaagt gatgaacctc 2160
 gaccgtttcg acctgctgta a 2181

<210> 32
 <211> 726
 <212> PRT
 5 <213> Escherichia coli

<400> 32

Met Ser Thr Ser Asp Asp Ile His Asn Thr Thr Ala Thr Gly Lys Cys
 1 5 10 15

Pro Phe His Gln Gly Gly His Asp Gln Ser Ala Gly Ala Gly Thr Thr
 20 25 30

ES 2 735 230 T3

Thr Arg Asp Trp Trp Pro Asn Gln Leu Arg Val Asp Leu Leu Asn Gln
 35 40 45
 His Ser Asn Arg Ser Asn Pro Leu Gly Glu Asp Phe Asp Tyr Arg Lys
 50 55 60
 Glu Phe Ser Lys Leu Asp Tyr Tyr Gly Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ala
 65 70 75 80
 Leu Leu Thr Glu Ser Gln Pro Trp Trp Pro Ala Asp Trp Gly Ser Tyr
 85 90 95
 Ala Gly Leu Phe Ile Arg Met Ala Trp His Gly Ala Gly Thr Tyr Arg
 100 105 110
 Ser Ile Asp Gly Arg Gly Gly Ala Gly Arg Gly Gln Gln Arg Phe Ala
 115 120 125
 Pro Leu Asn Ser Trp Pro Asp Asn Val Ser Leu Asp Lys Ala Arg Arg
 130 135 140
 Leu Leu Trp Pro Ile Lys Gln Lys Tyr Gly Gln Lys Ile Ser Trp Ala
 145 150 155 160
 Asp Leu Phe Ile Leu Ala Gly Asn Val Ala Leu Glu Asn Ser Gly Phe
 165 170 175
 Arg Thr Phe Gly Phe Gly Ala Gly Arg Glu Asp Val Trp Glu Pro Asp
 180 185 190
 Leu Asp Val Asn Trp Gly Asp Glu Lys Ala Trp Leu Thr His Arg His
 195 200 205
 Pro Glu Ala Leu Ala Lys Ala Pro Leu Gly Ala Thr Glu Met Gly Leu
 210 215 220
 Ile Tyr Val Asn Pro Glu Gly Pro Asp His Ser Gly Glu Pro Leu Ser
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Ala Ile Arg Ala Thr Phe Gly Asn Met Gly Met Asn Asp
 245 250 255
 Glu Glu Thr Val Ala Leu Ile Ala Gly Gly His Thr Leu Gly Lys Thr
 260 265 270
 His Gly Ala Gly Pro Thr Ser Asn Val Gly Pro Asp Pro Glu Ala Ala
 275 280 285

ES 2 735 230 T3

Pro Ile Glu Glu Gln Gly Leu Gly Trp Ala Ser Thr Tyr Gly Ser Gly
 290 295 300

Val Gly Ala Asp Ala Ile Thr Ser Gly Leu Glu Val Val Trp Thr Gln
 305 310 315 320

Thr Pro Thr Gln Trp Ser Asn Tyr Phe Phe Glu Asn Leu Phe Lys Tyr
 325 330 335

Glu Trp Val Gln Thr Arg Ser Pro Ala Gly Ala Ile Gln Phe Glu Ala
 340 345 350

Val Asp Ala Pro Glu Ile Ile Pro Asp Pro Phe Asp Pro Ser Lys Lys
 355 360 365

Arg Lys Pro Thr Met Leu Val Thr Asp Leu Thr Leu Arg Phe Asp Pro
 370 375 380

Glu Phe Glu Lys Ile Ser Arg Arg Phe Leu Asn Asp Pro Gln Ala Phe
 385 390 395 400

Asn Glu Ala Phe Ala Arg Ala Trp Phe Lys Leu Thr His Arg Asp Met
 405 410 415

Gly Pro Lys Ser Arg Tyr Ile Gly Pro Glu Val Pro Lys Glu Asp Leu
 420 425 430

Ile Trp Gln Asp Pro Leu Pro Gln Pro Ile Tyr Asn Pro Thr Glu Gln
 435 440 445

Asp Ile Ile Asp Leu Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ser Gly Leu Ser Val
 450 455 460

Ser Glu Leu Val Ser Val Ala Trp Ala Ser Ala Ser Thr Phe Arg Gly
 465 470 475 480

Gly Asp Lys Arg Gly Gly Ala Asn Gly Ala Arg Leu Ala Leu Met Pro
 485 490 495

Gln Arg Asp Trp Asp Val Asn Ala Ala Val Arg Ala Leu Pro Val
 500 505 510

Leu Glu Lys Ile Gln Lys Glu Ser Gly Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ile
 515 520 525

Ile Val Leu Ala Gly Val Val Gly Val Glu Lys Ala Ala Ser Ala Ala
 530 535 540

ES 2 735 230 T3

Gly Leu Ser Ile His Val Pro Phe Ala Pro Gly Arg Val Asp Ala Arg
545 550 555 560

Gln Asp Gln Thr Asp Ile Glu Met Phe Glu Leu Leu Glu Pro Ile Ala
565 570 575

Asp Gly Phe Arg Asn Tyr Arg Ala Arg Leu Asp Val Ser Thr Thr Glu
580 585 590

Ser Leu Leu Ile Asp Lys Ala Gln Gln Leu Thr Leu Thr Ala Pro Glu
595 600 605

Met Thr Ala Leu Val Gly Gly Met Arg Val Leu Gly Ala Asn Phe Asp
610 615 620

Gly Ser Lys Asn Gly Val Phe Thr Asp Arg Val Gly Val Leu Ser Asn
625 630 635 640

Asp Phe Phe Val Asn Leu Leu Asp Met Arg Tyr Glu Trp Lys Ala Thr
645 650 655

Asp Glu Ser Lys Glu Leu Phe Glu Gly Arg Asp Arg Glu Thr Gly Glu
660 665 670

Val Lys Phe Thr Ala Ser Arg Ala Asp Leu Val Phe Gly Ser Asn Ser
675 680 685

Val Leu Arg Ala Val Ala Glu Val Tyr Ala Ser Ser Asp Ala His Glu
690 695 700

Lys Phe Val Lys Asp Phe Val Ala Ala Trp Val Lys Val Met Asn Leu
705 710 715 720

Asp Arg Phe Asp Leu Leu
725

- <210> 33
- <211> 6329
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Plásmido pKD46

<400> 33

catcgattta ttatgacaac ttgacggcta catcattcac tttttcttca caaccggcac 60
ggaactcgct cgggctggcc ccggtgcatt ttttaaatac ccgcgagaaa tagagttgat 120
cgtcaaaacc aacattgcga ccgacgggtg cgatagcat ccgggtggtg ctcaaaagca 180
gcttcgctg gctgatacgt tggtcctcgc gccagcttaa gacgctaate cctaactgct 240

ES 2 735 230 T3

ggcgaaaaag atgtgacaga cgcgacggcg acaagcaaac atgctgtgcg acgctggcga 300
 tatcaaaatt gctgtctgcc aggtgatcgc tgatgtactg acaagcctcg cgtacccgat 360
 tatccatcgg tggatggagc gactcgttaa tcgcttccat gcgccgcagt aacaattgct 420
 caagcagatt tatcgccagc agctccgaat agcgccttc cccttgcccg gcgttaatga 480
 tttgcccaaa caggtcgtcg aaatgcggct ggtgcgcttc atccgggcga aagaaccccg 540
 tattggcaaa tattgacggc cagttaagcc attcatgcca gtaggcgcgc ggacgaaagt 600
 aaaccactg gtgataccat tcgcgagcct ccggatgacg accgtagtga tgaatctctc 660
 ctggcgggaa cagcaaaata tcacccggtc ggcaaaaaa ttctcgtccc tgatttttca 720
 ccacccctg accgcgaatg gtgagattga gaataaacc tttcattccc agcggtcgggt 780
 cgataaaaaa atcgagataa ccggtggcct caatcggcgt taaacccgcc accagatggg 840
 cattaaacga gtatcccggc agcaggggat cttttgcgc ttcagccata cttttcatac 900
 tcccgcatt cagagaagaa accaattgtc catattgcat cagacattgc cgtcactgcg 960
 tcttttactg gctcttctcg ctaaccaaac cggtaacccc gcttattaaa agcattctgt 1020
 aacaaagcgg gaccaaagcc atgacaaaaa cgcgtaacaa aagtgtctat aatcacggca 1080
 gaaaagtcca cattgattat ttgcacggcg tcacactttg ctatgccata gcatttttat 1140
 ccataagatt agcggatcct acctgacgct tttatcgcga actctctact gtttctccat 1200
 accggttttt ttgggaattc gagctctaag gaggtataa aaaatggata ttaatactga 1260
 aactgagatc aagcaaaagc attcactaac cccctttcct gttttcctaa tcagcccggc 1320
 atttcgcggg cgatattttc acagctatct caggagtca gccatgaacg cttattacat 1380
 tcaggatcgt cttgaggtc agagctgggc gcgtcactac cagcagctcg cccgtgaaga 1440
 gaaagaggca gaactggcag acgacatgga aaaaggcctg cccagcacc tgtttgaatc 1500
 gctatgcatc gatcatttgc aacgccacgg ggccagcaaa aaatccatta cccgtgcgtt 1560
 tgatgacgat gttgagtttc aggagcgcac gccagaacac atccggtaca tggttgaaac 1620
 cattgctcac caccaggttg atattgattc agaggtataa aacgaatgag tactgcactc 1680
 gcaacgctgg ctgggaagct ggctgaacgt gtcggcatgg attctgtcga cccacaggaa 1740
 ctgatcacca ctcttcgcca gacggcattt aaaggtgatg ccagcgatgc gcagttcatc 1800
 gcattactga tcggtgcaaa ccagtacggc cttaatccgt ggacgaaaga aatttacgcc 1860
 tttcctgata agcagaatgg catcgttccg gtgggtggcg ttgatggctg gtcccgcac 1920
 atcaatgaaa accagcagtt tgatggcatg gactttgagc aggacaatga atcctgtaca 1980
 tgccggattt accgcaagga ccgtaatcat ccgatctgcg ttaccgaatg gatggatgaa 2040
 tgccgccgcg aaccattcaa aactcgcgaa ggacagagaaa tcacggggcc gtggcagtcg 2100
 catcccaaac ggatgttacg tcataaagcc atgattcagt gtgcccgctc ggccttcgga 2160
 tttgctggta tctatgacaa ggatgaagcc gagcgcattg tcgaaaatac tgcatacact 2220

ES 2 735 230 T3

gcagaacgtc agccggaacg cgacatcact cgggtaacg atgaaacat gcaggagatt 2280
aacactctgc tgatcgccct ggataaaaca tgggatgacg acttattgcc gctctgttcc 2340
cagatatttc gccgcgacat tcgtgcatcg tcagaactga cacaggccga agcagtaaaa 2400
gctcttggat tcctgaaaca gaaagccgca gagcagaag tggcagcatg acaccggaca 2460
ttatcctgca gcgtaccggg atcgatgtga gagctgtcga acagggggat gatgcgtggc 2520
acaaattacg gctcggcgtc atcaccgctt cagaagtca caacgtgata gcaaaacccc 2580
gctccggaaa gaagtggcct gacatgaaaa tgtcctactt ccacaccctg cttgctgagg 2640
tttgaccgg tgtggctccg gaagttaacg ctaaagcact ggccctgggga aaacagtacg 2700
agaacgacgc cagaaccctg tttgaattca cttccggcgt gaatgttact gaatccccga 2760
tcatctatcg cgacgaaagt atgcgtaccg cctgctctcc cgatggttta tgcagtgacg 2820
gcaacggcct tgaactgaaa tgcccgttta cctcccggga tttcatgaag ttccggctcg 2880
gtggtttcga ggccataaag tcagcttaca tggcccaggt gcagtacagc atgtgggtga 2940
cgcgaaaaaa tgccgtgtac tttgccaaact atgaccgcg tatgaagcgt gaaggcctgc 3000
attatgtcgt gattgagcgg gatgaaaagt acatggcgag ttttgacgag atcgtgccgg 3060
agttcatcga aaaaatggac gaggcactgg ctgaaattgg ttttgtattt ggggagcaat 3120
ggcgatgacg catcctcacg ataatatccg ggtaggcgca atcaacttccg tctactccgt 3180
taciaagcga ggctgggtat ttcccggcct ttctgttacc cgaaatccac tgaaagcaca 3240
gcccgtggct gaggagataa ataataaacg aggggctgta tgcacaaagc atcttctgtt 3300
gagttaagaa cgagtatcga gatggcacat agccttgctc aaattggaat caggtttgtg 3360
ccaataccag tagaaacaga cgaagaatcc atgggtatgg acagttttcc ctttgatatg 3420
taacggtgaa cagttgttct acttttgttt gttagtcttg atgcttcact gatagataca 3480
agagccataa gaacctcaga tccttccgta tttagccagt atgttctcta gtgtggttcg 3540
ttgtttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca tacttacttt gcatgtcact 3600
caaaaatttt gcctcaaac tggtgagctg aatttttgca gttaaagcat cgtgtagtgt 3660
ttttcttagt ccgttacgta ggtaggaatc tgatgtaatg gttgttggtta ttttgtcacc 3720
attcattttt atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga tccatttgc tatctagttc 3780
aacttgaaa atcaacgtat cagtcgggcg gcctcgctta tcaaccacca atttcatatt 3840
gctgtaagtg tttaaatctt tacttattgg tttcaaaccc cattgggttaa gccttttaaa 3900
ctcatggtag ttattttcaa gcattaacat gaacttaaat tcatcaaggc taatctctat 3960
atthgccttg tgagttttct tttgtgtag ttcttttaat aaccactcat aaatcctcat 4020
agagtatttg ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta tattttatga attttttaaa 4080
ctggaaaaga taaggcaata tctcttcact aaaaactaat tctaattttt cgcttgagaa 4140

ES 2 735 230 T3

cttggcatag tttgtccact ggaaaatctc aaagccttta accaaaggat tcctgatttc 4200
 cacagttctc gtcatcagct ctctggttgc tttagctaata acaccataag cattttccct 4260
 actgatgttc atcatctgag cgtattgggt ataagtgaac gataccgtcc gttctttcct 4320
 tgtagggttt tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag cataaaatta gcttggtttc 4380
 atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagttcattt gctttgaaaa caactaatc 4440
 agacatacat ctcaattggg ctaggtgatt ttaatcacta taccaattga gatgggctag 4500
 tcaatgataa ttactagtcc ttttcctttg agttgtgggt atctgtaaata tctgctagac 4560
 ctttgctgga aaacttgtaa attctgctag accctctgta aattccgcta gacctttgtg 4620
 tgtttttttt gtttatattc aagtggttat aatttataga ataaagaaag aataaaaaaa 4680
 gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta ctttagtcag ttccgcagta 4740
 ttacaaaagg atgtcgcgaa cgctgtttgc tcctctacaa aacagacctt aaaaccctaa 4800
 aggcttaagt agcaccctcg caagctcggg tgcggccgca atcgggcaaa tcgctgaata 4860
 ttctttttgt ctccgaccat caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc 4920
 gctgcgctca cggtctggc agtgaatggg ggtaaattggc actacaggcg ctttttatgg 4980
 attcatgcaa ggaaactacc cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctacgggctt 5040
 tttatggcgg gtctgctatg tgggtgctatc tgactttttg ctgttcagca gttcctgccc 5100
 tctgattttc cagtctgacc acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa 5160
 tgcacccagt aaggcagcgg tatcatcaac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 5220
 acgttaaggg attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 5280
 ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta 5340
 ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt 5400
 tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 5460
 tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggtcca gatttatcag caataaacca 5520
 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc 5580
 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 5640
 tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttgggatgg cttcattcag 5700
 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atggtgtgca aaaaagcggg 5760
 tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 5820
 ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 5880
 gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc 5940
 ttgccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 6000
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 6060
 ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 6120

ES 2 735 230 T3

	ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg	6180
	gaaatggtga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta	6240
	ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataa caaaa taggggttcc	6300
	gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctg	6329
	<210> 34	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 34	
	aacaatatgt aagatctcaa ctatc	25
10	<210> 35	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 35	
	cagacatgag agatccagtg tgtag	25
	<210> 36	
	<211> 9332	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Plásmido pCP20	
	<400> 36	
	gagacacaac gtggctttgt tgaataaatc gaacttttgc tgagttgaag gatcagatca	60
	cgcatcttcc cgacaacgca gaccgttccg tggcaaagca aaagttcaaa atcaccaact	120
	ggtccaccta caacaaagct ctcatcaacc gtggctccct cactttctgg ctggatgatg	180
	gggcgattca ggctgggtat gagtcagcaa caccttcttc acgaggcaga cctcagcgcc	240
	acaggtgctg ttgctggcgc taaccgtttt tatcaggctc tgggaggcag aataaatgat	300
	catatcgtca attattacct ccacggggag agcctgagca aactggcctc aggcatattga	360
	gaagcacacg gtcacactgc ttccggtagt caataaaccg gtaaaccagc aatagacata	420
	agcggctatt taacgacct gccctgaacc gacgaccggg tcgaatttgc tttcgaattt	480
	ctgccattca tccgcttatt atcacttatt caggcgtagc aaccaggcgt ttaagggcac	540
	caataactgc cttaaaaaa ttacgccccg cctgccact catcgagta ctgttgtaat	600
25	tcattaagca ttctgccgac atggaagcca tcacaaaccg catgatgaac ctgaatcgcc	660

ES 2 735 230 T3

agcggcatca gcaccttgtc gccttgcgta taatatattgc ccatggtgaa aacgggggcg 720
 aagaagttgt ccatattggc cacgtttaa tcaaaactgg tgaactcac ccagggattg 780
 gctgagacga aaaacatatt ctcaataaac cctttaggga aataggccag gttttcaccg 840
 taacacgcca catcttgcca atatatgtgt agaaactgcc ggaaatcgtc gtggtattca 900
 ctccagagcg atgaaaacgt ttcagtttgc tcatggaaaa cgggtgaaca aggggtgaaca 960
 ctatcccata tcaccagctc accgtctttc attgccatac ggaattccgg atgagcattc 1020
 atcagggcggg caagaatgtg aataaaggcc ggataaaact tgtgcttatt tttctttacg 1080
 gtctttaaaa aggccgtaat atccagctga acggctctggg tataggtaaca ttgagcaact 1140
 gactgaaatg cctcaaaatg ttctttacga tgccattggg atatatcaac ggtggtatat 1200
 ccagtgattt ttttctccat tttagcttcc ttagctcctg aaaatctcga taactcaaaa 1260
 aatacgcccg gtagtgatct tatttcatta tggtgaaagt tggaacctct tacgtgccga 1320
 tcaacgtctc attttcgcca aaagttggcc cagggcttcc cgggtatcaac agggacacca 1380
 ggatttattt attctgcgaa gtgatcttcc gtcacaggta tttattcggc gcaaagtgcg 1440
 tcgggtgatg ctgccaaact actgatttag tgtatgatgg tgtttttgag gtgctccagt 1500
 ggcttctggt tctatcagct gtccctcctg ttcagctact gacgggggtgg tgcgtaacgg 1560
 caaaagcacc gccggacatc agcgcttggt tcggcgtggg tatgggtggca ggccccgtgg 1620
 ccgggggact gttgggcgcc tgtagtgcca tttaccccca ttcactgcca gagccgtgag 1680
 cgcagcgaac tgaatgtcac gaaaaagaca gcgactcagg tgcctgatgg tcggagacaa 1740
 aaggaatatt cagcgatttg cccgagcttg cgagggtgct acttaagcct ttagggtttt 1800
 aaggctctgtt ttgtagagga gcaaacagcg tttgcgacat ccttttgtaa tactgoggaa 1860
 ctgactaaag tagtgagtta tacacagggc tgggatctat tctttttatc tttttttatt 1920
 ctttctttat tctataaatt ataaccactt gaatataaac aaaaaaaca cacaaaggtc 1980
 tagcgggaatt tacagagggg ctagcagaat ttacaagttt tccagcaaag gtctagcaga 2040
 atttacagat acccacaact caaaggaaaa ggactagtaa ttatcattga ctagcccatc 2100
 tcaattggta tagtgattaa aatcacctag accaattgag atgtatgtct gaattagttg 2160
 ttttcaaagc aatgaacta gcgattagtc gctatgactt aacggagcat gaaaccaagc 2220
 taattttatg ctgtgtggca ctactcaacc ccacgattga aaacctaca aggaaagaac 2280
 ggacggtatc gttcaattat aaccaatagc ttcagatgat gaacatcagt agggaaaatg 2340
 cttatgggtg attagctaaa gcaaccagag agctgatgac gagaactgtg gaaatcagga 2400
 atcctttggg taaaggcttt gagattttcc agtggacaaa ctatgccaaag ttctcaagcg 2460
 aaaaattaga attagttttt agtgaagaga tattgcctta tcttttcag ttaaaaaaat 2520
 tcataaaata taatctggaa catgttaagt cttttgaaaa caaatactct atgaggattt 2580
 atgagtggtt attaaaagaa ctaacacaaa agaaaactca caaggcaaat atagagatta 2640

ES 2 735 230 T3

gccttgatga atttaagttc atgttaatgc ttgaaaataa ctacatgag tttaaaaggc 2700
 ttaaccaatg ggttttgaaa ccaataagta aagatttaa cacttacagc aatatgaaat 2760
 tgggtggttga taagcgaggc cgcccgactg atacgttgat tttccaagtt gaactagata 2820
 gacaaatgga tctcgttaacc gaacttgaga acaaccagat aaaaatgaat ggtgacaaaa 2880
 taccaacaac cattacatca gattcctacc tacataacgg actaagaaaa aactacacg 2940
 atgctttaac tgcaaaaatt cagctcacca gttttgaggc aaaatTTTTT agtgacatgc 3000
 aaagtaagta tgatctcaat ggttcgttct catggetcac gcaaaaacaa cgaaccacac 3060
 tagagaacat actggctaaa tacggaagga tctgaggttc ttatggctct tgtatctatc 3120
 agtgaagcat caagactaac aaacaaaagt agaacaactg ttcaccgtta catatcaaag 3180
 ggaaaactgt ccatatgcac agatgaaaac ggtgtaaaaa agatagatac atcagagctt 3240
 ttacgagttt ttggtgcatt taaagctggt caccatgaac agatcgacaa tgtaacagat 3300
 gaacagcatg taacacctaa tagaacaggt gaaaccagta aaacaaagca actagaacat 3360
 gaaattgaac acctgagaca acttgttaca gctcaacagt cacacataga cagcctgaaa 3420
 caggcgatgc tgcttatcga atcaaagctg ccgacaacac gggagccagt gacgcctccc 3480
 gtggggaaaa aatcatggca attctggaag aatagcgcc tgtttcgttt caggcaggtt 3540
 atcagggagt gtcagcgtcc tgcggttctc cggggcgttc gggtcatgca gcccgtaatg 3600
 gtgatttacc agcgtctgcc aggcataat tctaggcctg tctgcgcggt cgtagtacgg 3660
 ctggaggcgt tttccggtct gtagctccat gttcggaatg acaaaattca gctcaagccg 3720
 tcccttgctc tgggtgctcca cccacaggat gctgtactga tttttttcga gaccgggcat 3780
 cagtacacgc tcaaagctcg ccatcacttt ttcacgtcct cccgggggca gtccttctc 3840
 cgcgaacgac agaacaccgg acgtgtatth cttcgcaaat ggcgtggcat cgatgagttc 3900
 ccggacttct tccggattac cctgaagcac cgttgccctc tcgcggttac gtcctctccc 3960
 cagcaggtaa tcaaccggac cactgccacc accttttccc ctggcatgaa atttaactat 4020
 catcccgcgc cccctgttcc ctgacagcca gacgcagccg ggcagctca tccccgatgg 4080
 ccatcagtgc ggccaccacc tgaaccgggt caccggaaga ccaactgccc ctgttcacct 4140
 tacgggctgt ctgattcagg ttatttccga tggggccag ctgacgcagt aacggcggtg 4200
 ccagtgtcgg cagttttccg gaacgggcaa ccggtcccc caggcagacc cgccgcatcc 4260
 ataccgccag ttgtttacc tcacagcgtt caagtaaccg ggcattgttca tcatcagtaa 4320
 cccgtattgt gagcatcctc tcgctttca tcggtatcat taccatga acagaaatcc 4380
 cccttacacg gagcatcag tgactaaacg gggctgacg ctcagtggaa cgaaaactca 4440
 cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat 4500
 taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac 4560

ES 2 735 230 T3

caatgcttaa tcagtgagge acctatctca gcgatctgtc tattlegttc atccatagtt 4620
 gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt 4680
 gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggtccag atttatcagc aataaaccag 4740
 ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct 4800
 attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt 4860
 gttgccattg ctgcaggcat cgtgggtgca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc 4920
 tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttggtgcaa aaaagcgggt 4980
 agtccttcg gtccctcgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg 5040
 gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg 5100
 actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgta tgcggcgacc gagttgctct 5160
 tgcccggcgt caacacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcatc 5220
 attgaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt 5280
 tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt 5340
 tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg 5400
 aatggtgaa tactcatact ctccctttt caatattatt gaagcattta tcagggttat 5460
 tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg 5520
 cgcacattc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta 5580
 acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc ttctgtcttc aagaatttta taaaccgtgg 5640
 agcgggcaat actgagctga tgagcaattt ccggtgcacc agtgcccttc tgatgaagcg 5700
 tcagcacgac gttcctgtcc acggtacgcc tgcggccaaa tttgattcct ttcagctttg 5760
 ctctctgtcg gccctcattc gtgcgctcta ggatcctcta cgcgggacgc atcgtggccg 5820
 gcatcaccgg cgctgaggtc tgccctcgtga agaagggtgtt gctgactcat accaggcctg 5880
 aatcgcccca tcatccagcc agaaagtgag ggagccacgg ttgatgagag ctttgttgta 5940
 ggtggaccag ttggtgattt tgaactttt ctttgccacg gaacggctctg cgttgctcggg 6000
 aagatgcgtg atctgatcct tcaactcagc aaaagttcga tttattcaac aaagccgccg 6060
 tcccgtcaag tcagcgtaat gctctgccag tgttacaacc aattaaccaa ttctgattag 6120
 aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttattca tadcaggatt atcaatacca 6180
 tatttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact caccgaggca gttccatagg 6240
 atggcaagat cctggtatcg gtctgcgatt ccgactcgtc caacatcaat acaacctatt 6300
 aatttcccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa 6360
 tccggtgaga atggcagaat aggaacttcg gaataggaac ttcaaagcgt ttccgaaaac 6420
 gagcgttcc gaaaatgcaa cgcgagctgc gcacatacag ctactgttc acgtgcacc 6480
 tatatctcgc tgttgccctgt atatatatat acatgagaag aacggcatag tgctgttta 6540

ES 2 735 230 T3

tgcttaaattg cgtacttata tgcgtctatt tatgtaggat gaaaggtagt ctagtacctc 6600
 ctgtgatatt atcccattcc atgcggggta tcgtatgctt ccttcagcac taccctttag 6660
 ctgttctata tgcctgcaact cctcaattgg attagttctca tccttcaatg ctatcatttc 6720
 ctttgatatt ggatcatatg catagtaccg agaaactagt gcgaagtagt gatcagggtat 6780
 tgctgtttatc tgatgagtat acgttgtcct ggccacggca gaagcacgct tatcgtcca 6840
 atttcccaca acattagtca actccgtagg gcccttcatt gaaagaaatg aggtcatcaa 6900
 atgtcttcca atgtgagatt ttgggccatt ttttatagca aagattgaat aaggcgcatt 6960
 tttcttcaaa gctttattgt acgatctgac taagtattct ttaataatt ggtattcctg 7020
 tttattgctt gaagaattgc cggtcctatt tactcgtttt aggactggtt cagaattcct 7080
 caaaaattca tccaaatata caagtggatc gatcctacce cttgcgctaa agaagtatat 7140
 gtgcctacta acgcttgtct ttgtctctgt cactaaacac tggattatta ctcccagata 7200
 cttatcttgg actaatata atgatttcgg atcaacgctt ttaatatcgc tgaatcttcc 7260
 acaattgatg aaagtagcta ggaagaggaa ttggtataaa gtttttgtt ttgtaaatct 7320
 cgaagtatac tcaaacgaat ttagtatttt ctcaagtatc tcccagatgc tttcacctc 7380
 acttagaagt gctttaagca ttttttact gtggctatct cccttatctg cttcttccga 7440
 tgattcgaac tgtaattgca aactacttac aatatcagtg atatcagatt gatgtttttg 7500
 tccatagtaa ggaataattg taaattccca agcaggaatc aatttcttta atgaggcttc 7560
 cagaattggt gctttttgcg tcttgtatct aaactggagt gatttattga caatatcgaa 7620
 actcagcgaa ttgcttatga tagtattata gctcatgaat gtggctctct tgattgctgt 7680
 tccgttatgt gtaatcatcc aacataaata ggttagttca gcagcacata atgctatctt 7740
 ctcacctgaa ggtctttcaa acctttccac aaactgaoga acaagcacct taggtggtgt 7800
 tttacataat atatcaaatt gtggcataca acctccttag tacatgcaac cattatcacc 7860
 gccagaggta aaatagtcaa cacgcacggt gtagatatt tatcccttgc ggtgatagat 7920
 ttaacgtatg agcacaacaaa agaaaccatt aacacaagag cagcttgagg acgcacgtcg 7980
 ccttaaagca atttatgaaa aaaagaaaa tgaacttggc ttatcccagg aatctgtcgc 8040
 agacaagatg gggatggggc agtcaggcgt tggtgcttta ttaatggca tcaatgcatt 8100
 aaatgcttat aacgccgat tgcttcaaaa aattctcaaa gttagcgttg aagaatttag 8160
 cccttcaatc gccagagaaa tctacgagat gtatgaagcg gttagtatgc agccgtcact 8220
 tagaagtgag tatgagtacc ctgttttttc tcatgttcag gcagggatgt tctcacctaa 8280
 gcttagaacc tttaccaaaag gtgatgcgga gagatgggta agcacaacca aaaaagccag 8340
 tgattctgca ttctggcttg aggttgaagg taattccatg accgcaccaa caggctccaa 8400
 gccaaagctt cctgacggaa tgtaattct cgttgacct gagcaggctg ttgagccagg 8460

ES 2 735 230 T3

	tgatttctgc atagccagac ttgggggtga tgagtttacc ttcaagaaac tgatcagga	8520
	tagcggtcag gtgtttttac aaccactaaa cccacagtac ccaatgatcc catgcaatga	8580
	gagttgttcc gttgtgggga aagttatcgc tagtcagtgg cctgaagaga cgtttggtg	8640
	atcggcaagg tgttctggtc ggcgcatagc tgataacaat tgagcaagaa tctgcatttc	8700
	tttcagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac	8760
	caaaccgta ttcattcgtg attgcccctg agcgagacga aatacgcgat cgctgttaaa	8820
	aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg aacctgcca gcgcatcaac	8880
	aatatcttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg aatgctgttt tcccggggat	8940
	cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata aatgcttga tggtcggaag	9000
	aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat cattggcaac	9060
	gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcacgc ggcttcccat acaatcgata	9120
	gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc	9180
	atccatgttg gaatttaac gcggcctcga gcaagacgtt tcccgttgaa tatggctcat	9240
	aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatg atgatatt	9300
	tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt tt	9332
	<210> 37	
	<211> 80	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 37	
	atgtcgcaac ataacgaaaa gaaccacat cagcaccagt caccactaca cgattccagc	60
	gtgtaggctg gagctgcttc	80
10	<210> 38	
	<211> 82	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 38	
	ttacgccggg attttgtcaa tcttaggaat gcgtgaccac acgcggtgtg ctgtcatcag	60
	attccgggga tccgtcgacc tg	82
	<210> 39	
	<211> 1424	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Constructo sintético	
	<400> 39	

ES 2 735 230 T3

ttacgccggg attttgtcaa tcttaggaat gcgtgaccac acgcggtgtg ctgtcatcag 60
 attccgggga tccgtcgacc tgcagttcga agttcctatt ctctagaaag tataggaact 120
 tcagagcgct tttgaagctc acgctgccgc aagcactcag ggcgcaaggg ctgctaaagg 180
 aagcggaaca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gacccccgat gaatgtcagc 240
 tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcagt 300
 gggcttacat ggcatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg 360
 ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaaactg gatggctttc 420
 ttgccgcaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga 480
 tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag 540
 aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cgccgtgttc 600
 cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cgggtgccctg 660
 aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc 720
 gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg 780
 ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct 840
 gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg 900
 aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat 960
 ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc 1020
 atgcccagcg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg 1080
 gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc 1140
 tatcaggaca tagcgttggc taccogtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct 1200
 gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccatt cgcagcgcac cgccttctat 1260
 cgccttcttg acgagttctt ctaataaggg gatcttgaag ttctattcc gaagttccta 1320
 ttctctagaa agtataggaa cttcgaagca gctccagcct acacgctgga atcgtgtagt 1380
 ggtgactggg gctgatgtgg gttcttttcg ttatggtgcg acat 1424

- <210> 40
- <211> 2262
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

5

<400> 40
 atgtcgcaac ataacgaaaa gaaccacat cagcaccagt caccactaca cgattccagc 60
 gaagcgaaac cggggatgga ctcaactggca cctgaggacg gctctcatcg tccagcggt 120
 gaaccaacac cgccaggtgc acaacctacc gccccagggg gcctgaaagc ccctgatacg 180
 cgtaacgaaa aacttaattc tctggaagac gtacgcaaag gcagtgaaaa ttatgcgctg 240

ES 2 735 230 T3

accactaatc agggcgtgcg catcgccgac gatcaaaaact cactgcggtgc cggtagccgt 300
 ggtccaacgc tgctggaaga ttttattctg cgcgagaaaa tcaccactt tgaccatgag 360
 cgcattccgg aacgtattgt tcatgcacgc ggatcagccg ctcacggtta tttccagcca 420
 tataaaagct taagcgatat taccaaagcg gatttcctct cagatccgaa caaaatcacc 480
 ccagtatttg tacgtttctc taccgttcag ggtggtgctg gctctgctga taccgtgctg 540
 gatatccgtg gctttgccac caagttctat accgaagagg gtatTTTTga cctcgttggc 600
 aataacacgc caatcttctt tatccaggat gcgcataaat tccccgattt tgttcatgcg 660
 gtaaaaccag aaccgcactg ggcaattcca caagggcaaa gtgccacga tactttctgg 720
 gattatgttt ctctgcaacc tgaactctg cacaacgtga tgtgggcatg gtcggatcgc 780
 ggcatcccc gcagttaccg caccatggaa ggcttcggta ttcacacctt ccgcctgatt 840
 aatgccgaag ggaaggcaac gtttgtacgt ttccactgga aaccactggc aggtaaagcc 900
 tcactcgttt gggatgaagc acaaaaactc accggacgtg acccggactt ccaccgccgc 960
 gagttgtggg aagccattga agcaggcgat tttccggaat acgaactggg cttccagttg 1020
 attcctgaag aagatgaatt caagttcgac ttcgatcttc tcgatccaac caaacttacc 1080
 ccggaagaac tgggtcccgt tcagcgtgtc ggcaaaatgg tgctcaatcg caaccggat 1140
 aacttctttg ctgaaaacga acaggcggct ttccatcctg ggcatatcgt gccgggactg 1200
 gacttcacca acgatccgct gttgcagga cgtttgttct cctataccga tacacaaatc 1260
 agtcgtcttg gtgggccgaa tttccatgag attccgatta accgtccgac ctgcccttac 1320
 cataatttcc agcgtgacgg catgcatcgc atggggatcg aactaaccg gccgaattac 1380
 gaaccgaact cgattaacga taactggccg cgcgaaacac cgcgggggcc gaaacgcggc 1440
 ggttttgaat cataccagga gcgcgtggaa ggcaataaag ttcgcgagcg cagcccatcg 1500
 tttggcgaat attattccca tccgcgtctg ttctggctaa gtcagacgcc atttgagcag 1560
 cgccatattg tcgatggttt cagttttgag ttaagcaaaag tcgttcgtcc gtatattcgt 1620
 gagcgcgttg ttgaccagct ggcgatatt gatctcactc tggcccaggc ggtggcgaaa 1680
 aatctcggta tcgaaactgac tgacgaccag ctgaatatca cccacactcc ggacgtcaac 1740
 ggtctgaaaa aggatccatc cttaagtttg tacgccatc ctgacgggtga tgtgaaaggt 1800
 cgcgtggtag cgattttact taatgatgaa gtgagatcgg cagaccttct ggccattctc 1860
 aaggcgctga aggccaaagg cgttcatgcc aaactgctct actcccgaat ggtgaaagtg 1920
 actgcggatg acggtacggt gttgcctata gccgtacct ttgccgggtgc accttcgctg 1980
 acggtcgatg cggtcattgt cccttgccgc aatatcgcg atatcgctga caacggcgat 2040
 gccaaactact acctgatgga agcctacaaa caccttaaac cgattgcgct gccgggtgac 2100
 gcgcgcaagt ttaaagcaac aatcaagatc gctgaccagg gtgaagaagg gattgtggaa 2160

ES 2 735 230 T3

gctgacagcg ctgacggtag ttttatggat gaactgctaa cgctgatggc agcacaccgc 2220

gtgtgggtcac gcattcctaa gattgacaaa attcctgcct ga 2262

<210> 41

<211> 753

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 41

Met Ser Gln His Asn Glu Lys Asn Pro His Gln His Gln Ser Pro Leu
1 5 10 15

His Asp Ser Ser Glu Ala Lys Pro Gly Met Asp Ser Leu Ala Pro Glu
20 25 30

Asp Gly Ser His Arg Pro Ala Ala Glu Pro Thr Pro Pro Gly Ala Gln
35 40 45

Pro Thr Ala Pro Gly Ser Leu Lys Ala Pro Asp Thr Arg Asn Glu Lys
50 55 60

Leu Asn Ser Leu Glu Asp Val Arg Lys Gly Ser Glu Asn Tyr Ala Leu
65 70 75 80

Thr Thr Asn Gln Gly Val Arg Ile Ala Asp Asp Gln Asn Ser Leu Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Gly Pro Thr Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Arg Glu
100 105 110

Lys Ile Thr His Phe Asp His Glu Arg Ile Pro Glu Arg Ile Val His
115 120 125

Ala Arg Gly Ser Ala Ala His Gly Tyr Phe Gln Pro Tyr Lys Ser Leu
130 135 140

Ser Asp Ile Thr Lys Ala Asp Phe Leu Ser Asp Pro Asn Lys Ile Thr
145 150 155 160

Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala
165 170 175

Asp Thr Val Arg Asp Ile Arg Gly Phe Ala Thr Lys Phe Tyr Thr Glu
180 185 190

Glu Gly Ile Phe Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe Phe Ile
195 200 205

Gln Asp Ala His Lys Phe Pro Asp Phe Val His Ala Val Lys Pro Glu

ES 2 735 230 T3

210						215										220
Pro	His	Trp	Ala	Ile	Pro	Gln	Gly	Gln	Ser	Ala	His	Asp	Thr	Phe	Trp	
225					230					235					240	
Asp	Tyr	Val	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Thr	Leu	His	Asn	Val	Met	Trp	Ala	
				245					250					255		
Met	Ser	Asp	Arg	Gly	Ile	Pro	Arg	Ser	Tyr	Arg	Thr	Met	Glu	Gly	Phe	
			260					265					270			
Gly	Ile	His	Thr	Phe	Arg	Leu	Ile	Asn	Ala	Glu	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	
		275					280					285				
Val	Arg	Phe	His	Trp	Lys	Pro	Leu	Ala	Gly	Lys	Ala	Ser	Leu	Val	Trp	
	290					295					300					
Asp	Glu	Ala	Gln	Lys	Leu	Thr	Gly	Arg	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Arg	
305					310					315					320	
Glu	Leu	Trp	Glu	Ala	Ile	Glu	Ala	Gly	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Glu	Leu	
				325					330					335		
Gly	Phe	Gln	Leu	Ile	Pro	Glu	Glu	Asp	Glu	Phe	Lys	Phe	Asp	Phe	Asp	
			340					345					350			
Leu	Leu	Asp	Pro	Thr	Lys	Leu	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Pro	Val	Gln	
		355					360					365				
Arg	Val	Gly	Lys	Met	Val	Leu	Asn	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Phe	Ala	
	370					375					380					
Glu	Asn	Glu	Gln	Ala	Ala	Phe	His	Pro	Gly	His	Ile	Val	Pro	Gly	Leu	
385					390					395					400	
Asp	Phe	Thr	Asn	Asp	Pro	Leu	Leu	Gln	Gly	Arg	Leu	Phe	Ser	Tyr	Thr	
				405					410					415		
Asp	Thr	Gln	Ile	Ser	Arg	Leu	Gly	Gly	Pro	Asn	Phe	His	Glu	Ile	Pro	
			420					425					430			
Ile	Asn	Arg	Pro	Thr	Cys	Pro	Tyr	His	Asn	Phe	Gln	Arg	Asp	Gly	Met	
		435					440					445				
His	Arg	Met	Gly	Ile	Asp	Thr	Asn	Pro	Ala	Asn	Tyr	Glu	Pro	Asn	Ser	
	450					455					460					
Ile	Asn	Asp	Asn	Trp	Pro	Arg	Glu	Thr	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Arg	Gly	
465					470					475					480	

ES 2 735 230 T3

Gly Phe Glu Ser Tyr Gln Glu Arg Val Glu Gly Asn Lys Val Arg Glu
485 490 495

Arg Ser Pro Ser Phe Gly Glu Tyr Tyr Ser His Pro Arg Leu Phe Trp
500 505 510

Leu Ser Gln Thr Pro Phe Glu Gln Arg His Ile Val Asp Gly Phe Ser
515 520 525

Phe Glu Leu Ser Lys Val Val Arg Pro Tyr Ile Arg Glu Arg Val Val
530 535 540

Asp Gln Leu Ala His Ile Asp Leu Thr Leu Ala Gln Ala Val Ala Lys
545 550 555 560

Asn Leu Gly Ile Glu Leu Thr Asp Asp Gln Leu Asn Ile Thr Pro Pro
565 570 575

Pro Asp Val Asn Gly Leu Lys Lys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Tyr Ala
580 585 590

Ile Pro Asp Gly Asp Val Lys Gly Arg Val Val Ala Ile Leu Leu Asn
595 600 605

Asp Glu Val Arg Ser Ala Asp Leu Leu Ala Ile Leu Lys Ala Leu Lys
610 615 620

Ala Lys Gly Val His Ala Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Met Gly Glu Val
625 630 635 640

Thr Ala Asp Asp Gly Thr Val Leu Pro Ile Ala Ala Thr Phe Ala Gly
645 650 655

Ala Pro Ser Leu Thr Val Asp Ala Val Ile Val Pro Cys Gly Asn Ile
660 665 670

Ala Asp Ile Ala Asp Asn Gly Asp Ala Asn Tyr Tyr Leu Met Glu Ala
675 680 685

Tyr Lys His Leu Lys Pro Ile Ala Leu Ala Gly Asp Ala Arg Lys Phe
690 695 700

Lys Ala Thr Ile Lys Ile Ala Asp Gln Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu
705 710 715 720

Ala Asp Ser Ala Asp Gly Ser Phe Met Asp Glu Leu Leu Thr Leu Met
725 730 735

ES 2 735 230 T3

Ala Ala His Arg Val Trp Ser Arg Ile Pro Lys Ile Asp Lys Ile Pro
 740 745 750

Ala

5 <210> 42
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 42
 gatctgactg gtggtctata gttag 25

10 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 43
 gtagtatca tgatgtgtaa gtaag 25

20 <210> 44
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> Thermotoga neapolitana
 <400> 44

atggccttct tcgatatgcc ccttgaggaa ctgaaaaagt accggcctga aaggtacgag 60
 gagaaagatt tcgatgagtt ctggagggaa acacttaaag aaagcgaagg attccctctg 120
 gatcccgtct ttgaaaaggt ggactttcat ctcaaaacgg ttgaaacgta cgatgttact 180
 ttctctggat acagggggca gagaataaag ggctggcttc ttggtccgaa gttggcggaa 240
 gaaaagcttc catgcgtcgt gcagtacata ggttacaatg gtggaagggg tttccacac 300
 gactggctgt tctggccgtc aatgggttac atctgttttg tcatggacac cagggggcag 360
 ggaagcggct ggatgaaggg agacacaccg gattaccctg aggggccagt cgatccacag 420
 taccgccgat tcatgacgag gggcattctg gatccgggaa cctattacta caggcgagtc 480
 ttcgtggatg cggtcagggc ggtggaagca gccatttctt tcccagaggt ggattccagg 540
 aaggtggtgg tggccggagg cagtcagggg gggggaatcg cccttgcggt gagtgccctg 600
 tcgaacaggg tgaaggctct gctctcgat gtgccgtttc tgtgccactt cagaagggcc 660
 gtgcaacttg tcgacacaca cccatacgtg gagatcacca acttcctcaa aaccacagg 720
 gacaaagagg agattgtttt cagaacactt tcctacttcg atggtgtgaa ctttgacgca 780

ES 2 735 230 T3

	agggcaaagg tgccccccct gttttccggt gggtcatgg acaccatctg tcctccctcg	840
	acgggtcttcg ccgcttacia ccaactacgcc ggtccaaagg agatcagaat ctatccgtac	900
	aacaaccacg aaggtggagg ttctttccag gcaattgagc aggtgaaatt cttgaagaga	960
	ctatttgagg aaggctag	978
	<210> 45	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 45	
	atggcttct ttgacatgcc gctg	24
10	<210> 46	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 46	
	ttagccttct tcgaacaggc gttcag	27
	<210> 47	
	<211> 978	
20	<212> ADN	
	<213> Thermotoga neapolitana	
	<400> 47	
	atggccttct ttgacatgcc gctggaagaa ctgaaaaagt accgtccgga acgttacgag	60
	gaaaaagact ttgacgaatt ttggcgcgaa accctgaaag aatccgaggg tttcccactg	120
	gacccgggat ttgaaaaagt tgacttccac ctgaagaccg tcgaaactta cgacgtcacc	180
	ttcagcgggt atcgtggcca gcgtatcaaa ggttggctgc tggtagcga actggcggaa	240
	gagaaactgc cgtgtgttgt tcagtacatt ggttacaacg gtggccgtgg tttcccgcac	300
	gactggctgt tctggccgtc tatgggttac atctgcttcg ttatggacac ccgtggtcag	360
	ggtagcgggt ggatgaaggg tgatactccg gactaccggg aagggtccggt ggacccgcag	420
	taccgggct tcatgacgcg cggcatcctg gatcctggca cctattacta ccgtcgtgtg	480
	tttgtcagat ccgtgcgcgc cgttgaagcc gctatcagct tcccacgcgt cgattctcgt	540
	aaagtggtag ttgctgggtg ctctcaaggt ggcggcattg cactggcagt ttccgcgctg	600
	tccaaccgtg ttaaagccct gctgtgcgat gttccgttcc tgtgccactt ccgtcgtgcg	660
	gtacagctgg tggacacca cccgtacgta gaaattacga acttctgaa aaccatcgt	720
	gataaagaag agatcgtatt ccgtaccctg tcttactttg atggcgtaa ttttgcgct	780

ES 2 735 230 T3

	cgTgcaaaag taccggcgtc gttcagcgtg ggtctgatgg aactatattg tccgccgtct	840
	accgtattcg cagcctacaa ccaactacgt ggtccgaaag aaatccgat ctaccctac	900
	aacaaccacg aaggtggtgg ttctttccag gcaatcgaac aggttaaatt cctgaaacgc	960
	ctgttcgaag aaggctaa	978
	<210> 48	
	<211> 978	
	<212> ADN	
5	<213> Thermotoga maritima	
	<400> 48	
	atggccttct tcgatttacc actcgaagaa ctgaagaaat atcgtccaga gcggtacgaa	60
	gagaaagact tcgatgagtt ctgggaagag aactcgcag agagcgaaaa gttcccctta	120
	gaccccgctc tcgagaggat ggagtctcac ctcaaacag tcgaagcgta cgatgtcacc	180
	ttctccggat acaggggaca gaggatcaaa ggggtgctcc ttgttccaaa actggaagaa	240
	gaaaaacttc cctgcgttgt gcagtacata ggatacaacg gtggaagagg attccctcac	300
	gactggctgt tctggccttc tatgggttac atatgtttcg tcatggatac tcgaggtcag	360
	ggaagcggct ggctgaaagg agacacaccg gattaccctg aggggtcccgt tgaccctcag	420
	tatccaggat tcatgacaag aggaatactg gatcccagaa cttactacta cagacgagtc	480
	ttcacggacg ctgtcagagc cgttgaagct gctgcttctt ttcctcaggt agatcaagaa	540
	agaatcgtga tagctggagg cagtcagggg gccggaatag cccttgccgt gagcgtctc	600
	tcaaagaaag caaaggctct tctgtgcgat gtgccgtttc tgtgtcactt cagaagagca	660
	gtacagcttg tggatacga tccatacgcg gagatcacga actttctaaa gaccacaga	720
	gacaaggaag aaatcgtgtt caggactctt tcctatttcg atggagtga cttcgcagcc	780
	agagcgaaga tccctgcgct gttttctgtg ggtctcatgg acaacatttg tcctcctca	840
	acggttttcg ctgcctacaa ttactacgtg ggaccgaagg aaatcagaat ctatccgtac	900
	aacaaccacg agggaggagg ctctttccaa gcggttgaac aggtgaaatt cttgaaaaa	960
	ctatttgaga aaggctaa	978
	<210> 49	
	<211> 49	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 49	
15	taactgcagt aaggaggaat aggacatggg gttctcgac ctgcctctg	49
	<210> 50	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	

ES 2 735 230 T3

<223> Cebador

<400> 50

tgatctagat tagccctct caaacagttt ctttcagg 38

- 5 <210> 51
- <211> 1012
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Constructo sintético

10 <400> 51

```

taactgcagt aaggaggaat aggacatggc gttcttcgac ctgcctctgg aagaactgaa      60
gaaataccgt ccagagcgtt acgaagagaa ggacttcgac gagttctggg aggaaactct      120
ggcggagagc gaaaagtctt cgctggaccc agtgttcgag cgtatggaat ctcacctgaa      180
aacctgggag gcatatgacg ttactttttc tggttaccgt ggccagcgtg tcaaaggctg      240
gctgctgggt ccgaaactgg aggaagaaaa actgccgtgc gtagttcagt acatcggtta      300
caacggtggc cgtggctttc cgcaocgattg gctggtctgg ccgtctatgg gctacatttg      360
cttcgtcatg gatactcgtg gtcagggttc cggctggctg aaaggcgata ctccggatta      420
tccggagggc ccggtagacc cgcagtagcc tggcttcatg acgcgtggta ttctggatcc      480
gcgtacctat tactatcgcc gcgtttttac cgatgcagtt cgtgccgtag aggccgcggc      540
ttctttccct cagggtgacc aggagcgtat tgttatcgct ggtggctccc aggggtggcg      600
catcgccctg gcggtatctg cgctgagcaa gaaagctaag gcactgctgt gtgacgtccc      660
gttcctgtgt cacttccgtc gcgctgttca gctggtagat acccatccgt acgcggagat      720
tactaacttc ctgaaaactc accgcgacaa agaagaaatc gttttccgca ccctgtccta      780
tttcgacggc gttaacttcg cggctcgtgc aaaaattccg gcactgttct ctggttggct      840
gatggacaac atctgccctc cttctaccgt tttcgcggca tataactatt atgcgggtcc      900
gaaagaaatc cgtatctatc cgtacaacaa ccacgaaggc ggtggtagct ttcaggctgt      960
tgaacaagtg aaattcctga agaaactggt tgagaagggc taatctagat ca      1012

```

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para estabilizar la actividad de perhidrólisis de una enzima cuando está presente en una formulación compuesta de dicha enzima y un éster de ácido carboxílico, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar una formulación acuosa que comprende:

5 (i) al menos una enzima estructuralmente clasificada como una enzima CE-7 y que tiene actividad de perhidrólisis y un motivo identificativo que comprende:

(i) un motivo RGQ en los restos de aminoácidos 118-120;

(ii) un motivo GXSQG en los restos de aminoácidos 179-183; y

(iii) un motivo HE en los restos de aminoácidos 298-299

10 cuando se alinea con la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1 usando un método de alineamiento de CLUSTAL W;

(ii) al menos un excipiente oligosacárido que tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1250 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 9000; y

(iii) opcionalmente al menos un tensioactivo;

15 (b) secar por atomización la formulación acuosa de (a) para producir un polvo de enzima que comprende la al menos una enzima de (i) y el al menos un excipiente oligosacárido de (ii); y

(c) combinar el polvo de enzima secado por atomización de (b) con un éster de ácido carboxílico para producir dicha formulación, que comprende menos de 2000 ppm de agua, y que retiene sustancialmente la actividad de perhidrólisis de la al menos una enzima en dicha formulación.

20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el al menos un excipiente oligosacárido tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1700 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 15000.

25 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en donde el al menos un excipiente oligosacárido se selecciona del grupo que consiste en maltodextrina, xilano, manano, fucoidano, galactomanano, chitosán, pectina, inulina, levano, gaminano, amilopectina y sus mezclas, preferiblemente maltodextrina.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el éster de ácido carboxílico se selecciona del grupo que consiste en monoacetina, diacetina, triacetina, monopropionina, dipropionina, tripropionina, monobutirina, dibutirina, tributirina, y sus mezclas, preferiblemente triacetina.

30 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el al menos un tensioactivo está presente y es polisorbato 80.

6. El procedimiento de la reivindicación 1 o 3, en donde la al menos una enzima comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, en donde el resto de aminoácido 277 de la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20 se selecciona del grupo que consiste en alanina, valina, serina y treonina.

35 7. Una formulación que comprende:

(1) una formulación secada por atomización que comprende:

a) al menos una enzima estructuralmente clasificada como una enzima CE-7 y que tiene actividad de perhidrólisis y un motivo identificativo que comprende:

(i) un motivo RGQ en los restos de aminoácidos 118-120;

40 (ii) un motivo GXSQG en los restos de aminoácidos 179-183; y

(iii) un motivo HE en los restos de aminoácidos 298-299

cuando se alinea con la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1 usando un método de alineamiento de CLUSTAL W;

45 b) al menos un excipiente oligosacárido que tiene un peso molecular medio numérico de al menos aproximadamente 1250 y un peso molecular medio ponderado de al menos aproximadamente 9000; y

c) opcionalmente al menos un tensioactivo; combinado con

(2) un éster de ácido carboxílico;

en donde dicha formulación comprende menos de 2000 ppm de agua, y en donde dicho al menos un excipiente oligosacárido estabiliza la actividad de perhidrólisis de dicha al menos una enzima en dicha formulación.

5 8. La formulación de la reivindicación 7, en donde el éster de ácido carboxílico se selecciona del grupo que consiste en monoacetina, diacetina, triacetina, monopropionina, dipropionina, tripropionina, monobutirina, dibutirina, tributirina, y sus mezclas.

10 9. Una formulación desinfectante o para el cuidado de la ropa que comprende un primer componente y un segundo componente, comprendiendo dicho primer componente la formulación de la reivindicación 7 y comprendiendo dicho segundo componente una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno y opcionalmente un estabilizante de peróxido de hidrógeno, en donde dichos componentes permanecen separados hasta su uso.

15 10. Un procedimiento de producción de una formulación desinfectante o para el cuidado de la ropa que comprende el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa combinar la formulación producida en la etapa (c) de la reivindicación 1, con una disolución acuosa que comprende una fuente de peróxígeno.

11. Un procedimiento para producir un ácido peroxicarboxílico a partir de un éster de ácido carboxílico, que comprende

(a) proporcionar un conjunto de componentes de reacción, comprendiendo dichos componentes:

(1) la formulación de la reivindicación 7; y

20 (2) una fuente de peróxígeno; y

(b) combinar dichos componentes de reacción en condiciones de reacción acuosas adecuadas de modo que se produce un ácido peroxicarboxílico.

12. Un procedimiento para desinfectar una superficie dura u objeto inanimado que comprende el procedimiento de la reivindicación 11, que además comprende la etapa de

25 (a) poner en contacto dicha superficie dura u objeto inanimado con el ácido peroxicarboxílico producido en la reivindicación 11; o

(b) diluir dicho producto de ácido peroxicarboxílico y poner en contacto dicha superficie dura u objeto inanimado con el ácido peroxicarboxílico diluido.

30 13. Un procedimiento para decolorar, desodorizar, higienizar, desinfectar, blanquear o una de sus combinaciones, un artículo de ropa o producto textil, que comprende el procedimiento de la reivindicación 11, que además comprende la etapa de

(a) poner en contacto dicho artículo de ropa o producto textil con el ácido peroxicarboxílico producido en la reivindicación 11 o

35 (b) diluir dicho producto de ácido peroxicarboxílico y poner en contacto dicho artículo de ropa o producto textil con el ácido peroxicarboxílico diluido.