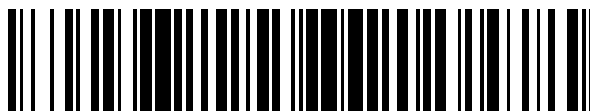


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 992**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2015** **PCT/EP2015/078131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016** **WO16087403**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2015** **E 15804382 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019** **EP 3227443**

54 Título: **Variantes de proteasa con desempeño de lavado mejorado**

30 Prioridad:

04.12.2014 DE 102014224825

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

07.05.2020

73 Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)

Henkelstrasse 67

40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

HELLMUTH, HENDRIK;

WEBER, THOMAS;

O'CONNELL, TIMOTHY;

TONDERA, SUSANNE;

LAUFS, BRIAN;

AYDEMIR, AYHAN y

LINDNER, CLAUDIA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 758 992 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

Variantes de proteasa con desempeño de lavado mejorado

La invención se encuentra en el campo de la tecnología de enzimas. La invención se refiere a proteasas cuya secuencia de aminoácidos ha sido modificada, principalmente con respecto al empleo en detergentes y productos de limpieza; todas las proteasas suficientemente similares tienen una modificación correspondiente y ácidos nucleicos que las modifican. La invención se refiere además a procedimientos y usos de estas proteasas, así como a los productos que las contienen, principalmente detergentes y productos de limpieza.

Las proteasas pertenecen en general a las enzimas más importantes en la industria. Para detergentes y productos de limpieza estas son las enzimas establecidas desde hace más tiempo y contenidas en prácticamente todos los detergentes y productos de limpieza potentes modernos. Estas causan la degradación de ensuciamientos que contienen proteína en el producto que va a limpiarse. Entre estas, a su vez, las proteasas de tipo subtilisina (subtilasas, subtilopeptidasas, EC 3.4.21.62) son particularmente importantes, las cuales debido a los aminoácidos con efecto catalítico son serina-proteasas. Estas actúan como endopeptidasas no específicas e hidrolizan cualquier enlace de amina ácida que se encuentre en el interior de péptidos o proteínas. Su pH óptimo se encuentra generalmente en la región distintivamente alcalina. Una sinopsis de esta familia es suministrada, por ejemplo, en el artículo "Subtilasas: Subtilisin-like Proteases" de R. Siezen, páginas 75-95 en "Subtilisin enzymes", editado por R. Bott y C. Betzel, Nueva York, 1996. Las subtilasas se forman de manera natural por los microorganismos. Entre estas pueden mencionarse principalmente las subtilisinas formadas y secretadas por la especie *Bacillus* como el grupo más importante dentro de la subtilasas.

Ejemplo de las proteasas del tipo subtilisina empleadas preferiblemente en detergentes y productos de limpieza son las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa de *Bacillus lentus*, principalmente de *Bacillus lentus* DSM 5483, subtilisina DY y las enzimas asignadas a la subtilasas, pero ya no las enzimas asignadas a las subtilisinas en el sentido más estrecho: termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7, así como variantes de las proteasas mencionadas que presentan una secuencia de aminoácidos modificada frente a la proteasa de partida. Las proteasas se modifican mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica de manera dirigida o aleatoria y, por ejemplo, se optimizan para el empleo en detergentes y productos de limpieza. Estos incluyen mutagénesis puntual, mutagénesis de supresión o inserción o fusión con otras proteínas o partes de proteína. De esta manera, para la mayor parte de proteasas conocidas por el estado de la técnica se conocen de manera correspondiente variantes optimizadas. Por la publicación WO 2012/080201 A2 se conocen variantes de subtilasas de *Bacillus lentus* DSM 5483 y por la publicación WO 2011/110625 A1 se conocen variantes de subtilasas de *Bacillus gibsonii* DSM 14391.

De manera sorprendente se ha encontrado que las variantes especiales de la proteasa alcalina de *Bacillus gibsonii* (dsm 14391) [Seq. ID 1] o de proteasas suficientemente similares a esta (con respecto a la identidad de secuencia) son adecuadas particularmente para el empleo en detergentes o productos de limpieza y son mejores con respecto a la potencia de lavado.

Por lo tanto, es objeto de la presente invención una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 por toda su longitud en al menos 90% y de modo cada vez más preferido en al menos 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% y 99% y presenta el aminoácido D en la posición 97 y/o el aminoácido E en la posición 99 en el recuento según SEQ ID NO. 1, en cuyo caso la proteasa en comparación con una proteasa según SEQ ID NO. 1 tiene un desempeño de limpieza mejorada.

La proteasa según la invención en el recuento de acuerdo con SEQ ID NO. 1 tiene preferentemente una o varias sustituciones de aminoácidos que se seleccionan entre N97D y R99E.

Proteasas particularmente preferidas son aquellas cuyas secuencias de aminoácidos son idénticas a las secuencias de aminoácidos indicadas en Seq. ID 4 a 6.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de una proteasa que comprende introducir una sustitución de aminoácido N97D y R99E, en el recuento según SEQ ID NO. 1 en una proteasa de partida, la cual es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 por toda su longitud en al menos 90% y de manera cada vez más preferida en al menos 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% y 99%, en donde la proteasa presenta un desempeño mejorado de limpieza en comparación con una proteasa según SEQ ID NO. 1.

Las posiciones de aminoácidos que se indican en el contexto de la presente invención con la formulación "recuento según SEQ ID NO. 1" se entienden de la siguiente manera: las otras posiciones de aminoácidos se definen por una alineación de la secuencia de aminoácidos de una proteasa según la invención con la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus gibsonii* (dsm 14391), tal como se indica en SEQ ID NO. 1. Además, la asignación de las posiciones depende de la proteína madura. Esta asignación puede aplicarse principalmente sin la secuencia de

aminoácidos de una proteasa según la invención comprende una cantidad más alta de residuos de aminoácidos que la proteasa de *Bacillus gibsonii* según SEQ ID NO. 1. A partir de las posiciones mencionadas en la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus gibsonii* las posiciones de modificación en una proteasa según la invención son aquellas que se asignan a estas mismas posiciones en una alineación. Por ejemplo, la proteasa según SEQ ID NO.2 tiene 374 aminoácidos. En la alineación con la proteasa según SEQ ID NO.1 resulta, por lo tanto, que las posiciones 97 y 99 según el recuento de acuerdo con SEQ ID NO.1 corresponden a las posiciones 202 y 204 en la propia secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2. una proteasa en el sentido de la presente solicitud de patente comprende tanto la proteasa como tal, como también una proteasa preparada con un procedimiento según la invención. Por lo tanto, todas las explicaciones sobre la proteasa se refieren tanto a la proteasa como sustancia, como también a los procedimientos correspondientes, principalmente procedimientos de preparación de la proteasa.

Otros objetos de la presente invención son ácidos nucleicos que codifican proteasas de la invención, proteasas o ácidos nucleicos según la invención que contienen células anfitrionas no humanas, así como productos, principalmente detergentes y productos de limpieza, que comprenden las proteasas según la invención, procedimientos de lavado y de limpieza y usos de las proteasas según la invención, principalmente en detergentes y productos de limpieza.

Una modificación según la invención N97D y/o R99E en una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 causa un desempeño de limpieza mejorado de estas proteasas modificadas en detergentes y productos de limpieza sobre al menos un ensuciamiento sensible a proteasa. Las proteasas según la invención hacen posible, por consiguiente, una eliminación mejorada de al menos un ensuciamiento, preferiblemente varios ensuciamientos sensibles a proteasa sobre textiles y/o superficies duras, por ejemplo, vajillas. Desempeños de limpieza particularmente ventajosos muestran formas preferida de realización de las proteasas según la invención sobre ensuciamientos que contienen sangre, por ejemplo, en los ensuciamientos de sangre-leche/tinta sobre algodón: producto No. C-05 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos y de huevo entero/pigmento sobre algodón: producto No. 10N disponible en wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, Alemania.

Mediante formas preferidas de realización de la presente invención se proporcionan proteasas específicas para la suciedad, cuyo rendimiento de limpieza con respecto a una suciedad o varias suciedades de tipo similar se mejora de manera dirigida, principalmente con respecto a suciedades que contienen sangre o huevo entero.

Formas preferidas de realización de las proteasas según la invención logran tales desempeños de limpieza ventajosos incluso ya a bajas temperaturas, principalmente en los

intervalos de temperaturas entre 10°C y 60°C, preferiblemente entre 15°C y 50°C y de modo particularmente preferido entre 20°C y 40°C. otras formas preferida de realización de las proteasas según la invención logran tales rendimientos de limpieza ventajosos en un amplio intervalo de temperaturas, por ejemplo, entre 15°C y 90°C, de preferencia entre 20°C y 60°C.

En el contexto de la invención, por rendimiento de limpieza se entiende el rendimiento de blanqueamiento de una o varias suciedades, principalmente sobre ropa o vajilla. En el contexto de la invención, tanto el detergente o el producto de limpieza que comprende la proteasa o el líquido de lavado con detergente o con producto de limpieza que se forma gracias a estos productos, como también la proteasa misma, presentan un respectivo rendimiento de limpieza. El desempeño de limpieza de la enzima contribuye, por lo tanto, al desempeño de limpieza del producto o del líquido de limpieza o detergente formado por el producto. El desempeño de limpieza se determina preferiblemente tal como se indica más adelante.

Una proteasa según la invención presenta una actividad proteolítica, es decir que es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos de un polipéptido o una proteína, principalmente en un detergente o producto de limpieza. Una proteasa según la invención es, por lo tanto, una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos y de esta manera es capaz de disociar péptidos o proteínas. Además, una proteasa según la invención es preferentemente una proteasa madura, es decir, la molécula activa catalíticamente sin señal(es) y/o propéptido(s). En tanto no se indique algo diferente, las secuencias indicadas también se refieren respectivamente a enzimas maduras.

La determinación de la entidad de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos se efectúa mediante una comparación de secuencias. Esta comparación de secuencias se basa en el algoritmo BLAST establecido en el estado de la técnica y utilizado habitualmente (cf., por ejemplo, Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410, y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, páginas 3389-3402) y se logra en principio asignando entre sí las sucesiones similares de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos. Una asignación tabular de las posiciones en cuestión se denomina alineación. Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA. Las comparaciones de secuencias (alineamientos) principalmente comparaciones múltiples de secuencias, se crean con programas de ordenador. Por ejemplo, la serie Clustal (véase, por ejemplo, Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (véase, por ejemplo, Notredame et al. (2000): T-Coffee:

A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas basados en estos programas o algoritmos se utilizan frecuentemente. En la presente solicitud de patente, todas las comparaciones de secuencias (alineamientos) se crearon con el programa de ordenador Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, Estados Unidos de América) con los parámetros estándar predefinidos, cuyo módulo AlignX para comparaciones de secuencias se basa en ClustalW.

Una comparación así también permite una declaración sobre la similitud de las secuencias comparadas entre sí. De esta manera, habitualmente la identidad se indica en porcentaje, es decir la fracción de los nucleótidos idénticos o residuos de aminoácidos de los mismos o en posiciones correspondientes entre sí en una alineación. El concepto de homología, comprendido más allá, se refiere en el caso de secuencias de aminoácidos a intercambios de aminoácidos conservados, es decir a aminoácidos con actividad química similar, ya que estos ejercen generalmente actividades químicas similares dentro de la proteína. Por lo tanto, la similitud entre las secuencias que se están comparando también pueden indicarse como homología porcentual o similitud porcentual. Las indicaciones de identidad y/o de homología pueden referirse a polipéptidos completos o genes o solamente a regiones individuales. Regiones homólogas o idénticas de diferentes secuencias de ácido nucleico o aminoácidos se definen, por lo tanto, por las coincidencias en las secuencias. Tales regiones tienen frecuentemente funciones idénticas. Pueden ser pequeñas y comprenden solamente pocos nucleótidos o aminoácidos. Con frecuencia, tales pequeñas regiones ejercen funciones esenciales para la actividad total de la proteína. Por lo tanto, puede ser práctico, referir las coincidencias de secuencia solamente a regiones individuales, opcionalmente pequeñas. A menos que se indique de otra manera, no obstante, los datos de identidad o de homología en la presente solicitud se refieren a la longitud total de la secuencia indicada de ácido nucleico o aminoácidos.

El desempeño de limpieza de una proteasa según la invención corresponde preferentemente al menos a aquel de una proteasa que comprende a una secuencia de aminoácidos la cual corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1, y/o al menos a aquel de una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 3, en cuyo caso se determina el desempeño de limpieza en un sistema de lavado, que contiene un detergente en una dosis entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de líquido de lavado, así como la proteasa, en donde las proteasas que van a compararse se emplean en igual concentración (con respecto a la proteína activa) y el desempeño de limpieza se determina frente a una mancha de sangre o una mancha de huevo entero sobre algodón, principalmente frente a la mancha de sangre-leche/tinta sobre algodón: producto No. C-05 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos o huevo entero/pigmento sobre algodón: producto No. 10N disponible en wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, Alemania, midiendo el grado de blancura de los textiles lavados, la operación de lavado se efectúa durante 70 minutos a una temperatura de 40 °C y el agua presenta una dureza entre 15,5 y 16,5° (dureza alemana). La concentración de la proteasa en el detergente determinado para este sistema de lavado es de 0,001-0,1 % en peso, de preferencia de 0,01 a 0,06 % en peso, con respecto a la proteína activa.

Un detergente líquido preferido para un sistema de lavado de este tipo se compone tal como sigue (todos los datos en porcentaje en peso): 0,3-0,5 % xantano, 0,2-0,4% de antiespumante, 6-7% de glicerina, 0,3-0,5% de etanol, 4-7% de FAEOS (éter-sulfato de alcohol graso), 24-28% de tensioactivos no iónicos, 1% de ácido bórico, 1-2% de citrato de sodio (dihidrato), 2-4% de carbonato de sodio, 14-16% de ácidos grasos de coco, 0,5% de HEDP (ácido 1-hidroxietano-(1,1-di-fosfónico)), 0-0,4% de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05% de abrillantador óptico, 0-0,001% de colorante, el resto es agua desmineralizada. La dosis del detergente líquido se encuentra preferiblemente entre 4,5 y 6,0 gramos por litro de líquido de lavado, por ejemplo, 4,7, 4,9 o 5,9 gramos por litro de líquido de lavado. Preferiblemente se lava en un intervalo de valores de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferiblemente entre pH 8 y pH 9.

Un detergente pulverulento preferido para un sistema de lavado de este tipo está compuesto tal como sigue (todos los datos en porcentaje en peso): 10% de sulfonato de alquilo-benceno lineal (sal de sodio), 1,5% de sulfato de alcohol graso de C12-C18 (sal de sodio), 2,0% de alcohol graso de C₁₂-C₁₈ con 7 EO, 20% de carbonato de sodio, 6,5% de hidrogenocarbonato de sodio, 4,0% de disilicato de sodio amorfo, 17% de carbonato de sodio - peroxohidrato, 4,0% de TAED, 3,0% de poliacrilato, 1,0% de carboximetilcelulosa, 1,0% de fosfonato, 27% de sulfato de sodio, el resto: inhibidores de espuma, abrillantadores ópticos, fragancias. La dosificación del detergente pulverulento se encuentra preferiblemente entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de líquido de lavado, por ejemplo, y de modo particularmente preferido 4,7 gramos por litro de líquido de lavado, o 5,5, 5,9 o 6,7 gramos por litro de líquido de lavado. Preferiblemente se lava en un intervalo de pH entre pH 9 y pH 11.

La determinación del desempeño de limpieza se efectúa preferentemente a 40 °C con el uso de un detergente líquido tal como se indicado antes, en donde la operación de lavado se realiza preferiblemente durante 70 minutos.

El grado de blancura, es decir el aclaramiento de las manchas, se determina como medida para el desempeño de limpieza preferiblemente con procedimientos de medición ópticos, preferiblemente de modo fotométrico. Un instrumento apropiado para esto es, por ejemplo, el espectrómetro Minolta CM508d. Habitualmente, los instrumentos empleados para la medición se calibran previamente con un estándar blanco, preferiblemente un estándar blanco suministrado conjuntamente.

Procedimientos para la determinación de la actividad de proteasa son familiares para el especialista en el campo de la tecnología de enzimas y se aplican por parte del mismo de manera rutinaria. A manera de ejemplo, tales procedimientos se encuentran divulgados en Tenside, volumen 7 (1970), páginas 125-132. Como alternativa, la actividad de proteasa puede determinarse por la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilida (AAPF). la proteasa disocia el sustrato y libera pNA. La liberación de la pNA ocasiona un incremento de la extinción a 410 nm, cuyo transcurso temporal es una medida de la actividad enzimática (cf. Del Mar et al., 1979). La medición se efectúa a una temperatura de 25 °C, a pH 8,6, y una longitud de onda de 410 nm. el tiempo de mediciones de 5 minutos y el intervalo de medición de 20 segundos a 60 segundos. La actividad de proteasa se indica habitualmente en unidades de proteasa (PE). Actividades de proteasa adecuadas son, por ejemplo, de 2,25, 5 o 10 PE por ml de líquido de lavado. La actividad de proteasa, no obstante, no es igual a cero.

La concentración de proteína puede determinarse con ayuda de procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento BCA (ácido bicinonínico; ácido 2,2'-bicinolí-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de biureta (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), páginas 751-766). La determinación de la concentración de proteína activa puede efectuarse a este respecto por medio de una titulación de los centros activos usando un inhibidor irreversible adecuado (para proteasas, por ejemplo, cloruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) y determinación de la actividad residual (cf. M. Bender et al., J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), páginas 5890-5913).

Las proteínas pueden combinarse en grupos de proteínas relacionadas de modo inmunológico mediante la reacción con un antisuero o un anticuerpo determinado. Los miembros de un grupo tal se caracterizan porque estos mismos presentan determinantes antigénicos reconocidos por un anticuerpo. Por lo tanto, son tan similares estructuralmente entre sí, que se reconocen por un antisuero o por anticuerpos determinados. Por lo tanto, otro objeto de la invención lo conforman proteasas que se caracterizan porque tienen al menos una, y de modo cada vez más preferido, dos, tres o cuatro determinantes antigénicos coincidentes con una proteasa según la invención. Debido a sus coincidencias inmunológicas, tales proteasas son estructuralmente tan similares a las proteasas según la invención que también puede suponerse una función similar.

De modo adicional a las modificaciones de aminoácido anteriormente explicadas, las proteasas según la invención pueden tener otras modificaciones de aminoácidos, principalmente sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. Tales proteasas se han desarrollado aún más, por ejemplo, mediante modificación genética dirigida, es decir mediante procedimientos de mutagénesis, y se han optimizado para determinados propósitos de empleo o con respecto a propiedades especiales (por ejemplo, con respecto a su actividad catalítica, estabilidad, etc.). Además, pueden introducirse ácidos nucleicos según la invención con estrategias de recombinación, por lo tanto, aprovecharse para generar proteasas, u otros polipéptidos, completamente nuevos.

El objetivo es introducir en las moléculas conocidas mutaciones dirigidas como sustituciones, inserciones o supresiones para mejorar, por ejemplo, el desempeño de limpieza de enzimas según la invención. Para esto pueden modificarse principalmente las cargas superficiales y/o el punto isoeléctrico de las moléculas y, de esta manera, sus interacciones con el sustrato. De esta manera, la carga neta de la enzima puede modificarse para influir así en la formación de sustrato, principalmente para el empleo en detergentes y productos de limpieza. Como alternativa o como complemento, la estabilidad de las proteasas puede incrementarse mediante una o varias mutaciones correspondientes y, de esta manera, puede mejorarse su desempeño de limpieza. Las propiedades ventajosas de mutaciones individuales, por ejemplo, de sustituciones individuales, pueden complementarse entre sí. Una proteasa ya optimizada con respecto a determinadas propiedades, por ejemplo, con respecto a su estabilidad frente a tensioactivos y/o blanqueadores y/u otros componentes, puede desarrollarse adicionalmente aún más, por lo tanto, en el contexto de la invención.

Para la descripción de sustituciones que conciernen exactamente una posición de aminoácido (intercambios de aminoácidos), se aplica la siguiente convención: primero, el aminoácido naturalmente presente se denomina en la forma del código de una letra internacionalmente aceptado, luego sigue la posición de secuencia correspondiente y finalmente el aminoácido insertado. varios intercambios dentro de la misma cadena de polipéptido se separan por medio de barras. En el caso de inserciones, los aminoácidos adicionales se designan según la posición de secuencia. En el caso de supresiones, el aminoácido faltante se reemplaza por un símbolo, tal como un asterisco o una raya. A manera de ejemplo, A95G describe la sustitución de alanina en la posición 95 por glicina, A95AG describe la inserción de glicina después del aminoácido alanina en posición 95 y A95* describe la supresión de alanina en posición 95. Esta nomenclatura es familiar para el especialista en el campo de la tecnología de enzimas.

Otro objeto de la invención es, por lo tanto, una proteasa, la cual en el recuento según SEQ ID NO. 1 presenta el aminoácido D en la posición 97 y/o el aminoácido E en la posición 99, y la cual puede obtenerse a partir de una proteasa según la invención en calidad de molécula de partida por medio de una sustitución conservadora simple o múltiple de aminoácido. El término "sustitución conservadora de aminoácido" significa el intercambio (sustitución) de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido, en donde este intercambio no conduce a una modificación de la polaridad o carga en la posición del aminoácido intercambiado, por ejemplo, el intercambio de un residuo de aminoácido no polar. Sustituciones conservadoras de aminoácidos en el contexto de la invención comprenden, por ejemplo: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

Otro objeto de la presente invención es una proteasa la cual presenta en el recuento según SEQ ID NO. 1 en la posición 97 el aminoácido D y/o en la posición 99 el aminoácido E y la cual puede obtenerse a partir de una proteasa según la invención en calidad de molécula de partida mediante fragmentación, mutagénesis de supresión, inserción o sustitución y comprende una secuencia de aminoácidos que coincide con la molécula de partida por una longitud de al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 266 aminoácidos relacionados.

De esta manera, por ejemplo, es posible suprimir en los extremos o en el bucle de la enzima aminoácidos individuales sin causar por esto una pérdida o una reducción en la actividad proteolítica. Además, mediante tal fragmentación, mutagénesis de supresión, inserción o sustitución es posible, por ejemplo, disminuir también la alergenicidad de las enzimas en cuestión y de esta manera mejorar su aplicabilidad total. De manera ventajosa, las enzimas mantienen su actividad proteolítica incluso después de la mutagénesis; es decir que su actividad proteolítica corresponde al menos a aquella de la enzima de partida. Las sustituciones también pueden mostrar efectos ventajosos. Uno o varios aminoácidos correlacionados pueden intercambiarse por otros aminoácidos.

Todos los hechos mencionados también son aplicables al procedimiento para la preparación de una proteasa según la invención. Por consiguiente, un procedimiento según la invención comprende además una o varias de las siguientes etapas procedimentales:

(a) introducir una sustitución conservadora de aminoácidos, individual o múltiple en una proteasa según la invención, en donde el aminoácido D en la posición 97 y/o el aminoácido E en la posición 99 permanecen sin modificar en el recuento según SEQ ID NO. 1;

(b) modificar la secuencia de aminoácidos en una proteasa mediante fragmentación, mutagénesis de supresión, inserción o sustitución de modo que la proteasa comprenda una secuencia de aminoácidos que coincide con la molécula de partida por una longitud de al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 266 aminoácidos correlacionados, en donde el aminoácido D en la posición 97 y/o el aminoácido E en la posición 99 permanecen sin modificar en el recuento según SEQ ID NO. 1.

Todas las declaraciones también son válidas para los procedimientos según la invención.

Una proteasa según la invención puede estabilizarse adicionalmente, principalmente por medio de una o varias mutaciones, por ejemplo, sustituciones o mediante acoplamiento a un polímero. Puesto que un incremento de la estabilidad durante el almacenamiento y/o durante el empleo, por ejemplo, en un procedimiento de lavado conduce a que la actividad enzimática dure más y, por lo tanto, se mejoran el desempeño de lavado. Fundamentalmente se toman en consideración todas las posibilidades de estabilización convenientes y/o descritas en el estado de la técnica. Se prefieren aquellas estabilizaciones que se logran mediante mutaciones de la enzima misma ya que dichas estabilizaciones no requieren etapas adicionales de operación después de la obtención de la enzima. Las modificaciones de secuencia adecuadas para esto son conocidas en el estado de la técnica. Por lo tanto, las proteasas pueden estabilizarse, por ejemplo, intercambiando uno o varios residuos de tirosina por otros aminoácidos.

Otras posibilidades de la estabilización son, por ejemplo:

- modificación del enlace de iones metálicos, principalmente de los sitios de enlace de calcio, por ejemplo, intercambiando uno o varios aminoácidos que participan en el enlace de calcio por uno o varios aminoácidos cargados negativamente y/o introduciendo modificaciones de secuencia en al menos una de las secuencias de los dos aminoácidos arginina/glicina;

- protección frente a la influencia de agentes de desnaturalización tales como tensioactivos mediante mutaciones que provocan una modificación de la secuencia de aminoácidos o en la superficie de la proteína;

- intercambios de aminoácidos que se encuentran cerca del terminal N, por aquellos que supuestamente entran en contacto con el resto de la molécula por medio de interacciones no covalentes y contribuyen de esta manera a mantener la estructura globular.

Formas preferidas de realización son aquellas en las cuales la enzima se estabiliza de varias maneras ya que varias mutaciones estabilizantes tienen un efecto aditivo o sinérgico.

Otro objeto de la invención es una proteasa tal como se ha descrito antes la cual se caracteriza porque presenta al menos una modificación química. una proteasa con una modificación tal se denomina derivado, es decir que la proteasa se derivatiza.

En el sentido de la presente solicitud, por consiguiente, por derivado se entienden tales proteínas cuya cadena de aminoácidos pura ha sido modificada de manera química. Tales derivatizaciones pueden efectuarse, por ejemplo, in vivo por la célula anfitriona que expresa la proteína. A este respecto se ponen de relieve los acoplamientos de compuestos de bajo peso molecular, tales como lípidos u oligosacáridos. Pero las derivatizaciones también pueden

realizarse in vitro, por ejemplo, mediante la conversión química de una cadena lateral de un aminoácido o mediante enlace covalente de otro compuesto con la proteína. A manera de ejemplo, es posible el acoplamiento de aminos a grupos carboxilo de una enzima para modificar el punto isoeléctrico. Otro compuesto de este tipo también puede ser otra proteína que se enlaza a una proteína según la invención por medio de compuestos químicos bifuncionales.

Asimismo, por derivatización puede entenderse el enlace covalente a un soporte macromolecular, o también una inclusión no covalente en estructuras macromoleculares de jaula que sean adecuadas. Las derivatizaciones pueden influir, por ejemplo, en la especificidad de sustrato o en la fuerza de enlace con el sustrato, o pueden causar un bloqueo transitorio de la actividad enzimática, si la sustancia acoplada es un inhibidor. Esto puede ser práctico, por ejemplo, para el lapso de tiempo del almacenamiento. Tales modificaciones también pueden afectar la estabilidad o la actividad enzimática. También pueden servir para reducir la alergenicidad y/o inmunogenicidad de la proteína e incrementar de esta manera, por ejemplo, su compatibilidad con la piel. Por ejemplo, los acoplamientos con compuestos macromoleculares tales como polietilenglicol mejoran la proteína en términos de estabilidad y/o compatibilidad con la piel.

Por derivados de una proteína según la invención también pueden entenderse en el sentido más amplio preparaciones de esta proteína. Dependiendo de la obtención, el tratamiento o la preparación, una proteína puede asociarse con otras sustancias diversas, por ejemplo, del cultivo de los microorganismos productores. También pueden mezclarse deliberadamente una proteína con otras sustancias, por ejemplo, para incrementar su estabilidad durante el almacenamiento. Por esto también todas las preparaciones de una proteína según la invención son según la invención. Esto también depende de si en una preparación determinada realmente despliega esta actividad enzimática o no. Esto es porque puede ser deseable no tener, o tener muy poca actividad durante el almacenamiento y desplegar su función enzimática solamente en el momento de uso. Esto puede controlarse, por ejemplo, mediante sustancias acompañantes adecuadas. Principalmente, a este respecto es posible la preparación conjunta de proteasas con inhibidores de proteasa.

Con respecto a todas las proteasas, o variantes y/o derivados de proteasa descritos antes, en el contexto de la presente invención particularmente se prefieren aquellos cuya actividad corresponda al menos a aquella de la proteasa según SEQ ID NO. 1 y/o SEQ ID NO. 3 y/o su desempeño de limpieza corresponda al menos a aquella de la proteasa SEQ ID NO. 1 y/o SEQ ID NO. 3, en cuyo caso el desempeño de limpieza se determina en un sistema de lavado tal como se describe anteriormente.

Otro objeto de la invención es un ácido nucleico que codifica una proteasa según la invención, así como un vector que contiene un tal ácido nucleico, principalmente un vector de clonación o un vector de expresión.

Este puede tratarse de moléculas de ADN o ARN. Pueden estar presentes en forma de hebra única, como una hebra única complementaria a esta hebra única, o como hebra doble. Principalmente en el caso de moléculas de ADN, la secuencia de ambas hebras complementarias han de tomarse en cuenta respectivamente en todos los tres marcos de lectura. Además, debe tenerse en cuenta que pueden codificarse diferentes codones, es decir tripletes de base, para los mismos aminoácidos de modo que una secuencia de aminoácidos determinada pueda codificarse por varios ácidos nucleicos diferentes. Debido a esta degeneración del código genético, todas las secuencias de ácido nucleico que pueden codificar una de las proteasas como se han descrito antes se incluyen en este objeto de la invención. El especialista en la materia es capaz de determinar sin dudas estas secuencias de ácido nucleico puesto que, a pesar de la degeneración del código genético, se asignan codones individuales a aminoácidos definidos. Por lo tanto, a partir de una secuencia de aminoácidos el especialista puede determinar sin problemas los ácidos nucleicos que codifican para esta secuencia de aminoácidos. Además, en el caso de ácidos nucleicos según la invención, uno o varios codones pueden reemplazarse por codones sinónimos. Este aspecto se refiere principalmente a la expresión heteróloga de las enzimas según la invención. Por lo tanto, cada organismo, por ejemplo, una célula anfitriona de una cepa de producción, posee un uso determinado de codón. Por uso de codón se entiende la traducción del código genético en aminoácidos por el respectivo organismo. Puede llegarse a pasos estrechos en la biosíntesis de proteínas si los codones que se encuentran sobre el ácido nucleico en el organismo se enfrentan a una cantidad comparativamente baja de moléculas de ARNt cargadas. Aunque codifica para el mismo aminoácido, esto conduce a que en el organismo un codón se traduce de modo menos eficiente que un codón sinónimo que codifica el mismo aminoácido. Debido a la presencia de una cantidad más alta de moléculas de ARNt para el codón sinónimo, éste puede traducirse de modo más eficiente en el organismo.

Para un especialista en la materia, mediante procedimientos generalmente conocidos hoy en día, como, por ejemplo, la síntesis química o la reacción en cadena de polimerasa (PCR), en unión con procedimientos estándar de microbiología y/o de química de las proteínas, es posible preparar los ácidos nucleicos correspondientes hasta los genes completos por medio de secuencias de ADN y/o de aminoácidos conocidas. Procedimientos de este tipo son conocidos, por ejemplo, por Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Cold Spring Laboratory Press.

En el sentido de la presente invención, por vectores se entienden elementos que se componen de ácidos nucleicos y los cuales contienen un ácido nucleico según la invención como región de ácido nucleico característica. Éstos están en capacidad de establecerlos en una especie o una línea celular durante varias generaciones o divisiones celulares como un elemento genético estable. Principalmente al usar en bacterias los vectores son plásmidos especiales, es

decir elementos genéticos circulares. En el contexto de la presente invención, un ácido nucleico según la invención se clona en un vector. Los vectores incluyen, por ejemplo, aquellos cuyo origen son plásmidos bacterianos, virus o bacteriófagos, o de manera preponderante vectores sintéticos o plásmidos con elementos de la más diferente procedencia. Con los otros elementos genéticos respectivamente presentes, los vectores son capaces de establecerse en las respectivas células anfitrionas durante varias generaciones como unidades estables. Pueden presentarse de modo extra-cromosómico como unidades propias o integrarse en un cromosoma o en ADN cromosómico.

Vectores de expresión comprenden secuencias de ácido nucleico que los habilitan para replicar en las células anfitrionas que los contienen, de preferencia los microorganismos, de modo particularmente preferido bacterias, y allí expresan un ácido nucleico contenido. La expresión es influenciada principalmente por el o los promotores que regulan la transcripción. En teoría, la expresión puede efectuarse por el promotor natural, localizado originalmente antes del ácido nucleico que va a expresarse, pero también por un promotor de la célula anfitriona suministrado en el vector de expresión, o incluso por un promotor modificado u otro completamente diferente de otro organismo u otra célula anfitriona. En el caso presente, se proporciona al menos un promotor para la expresión de un ácido nucleico según la invención y se utiliza para su expresión. Los vectores de expresión también pueden ser regulables, por ejemplo, cambiando las condiciones de cultivo o al alcanzar una densidad de célula determinada de las células anfitrionas que los contienen, o por adición de determinadas sustancias, principalmente activadores de expresión del gen. Un ejemplo de una tal sustancia es el derivado de galactosa isopropil- β -D-tiogalactopiranosida (IPTG), la cual se usa como activador del operón bacteriano de lactosa (lac-operón). En contraste con los vectores de expresión, el ácido nucleico contenido no se expresa en vectores de clonación.

Otro objeto de la invención es una célula anfitriona no humana que contiene un ácido nucleico según la invención o un vector según la invención o la cual contiene una proteasa según la invención, principalmente una que secreta la proteasa al medio que rodea la célula anfitriona. Un ácido nucleico según la invención o un vector según la invención preferiblemente se transforman en un microorganismo, el cual luego representa una célula anfitriona según la invención. Como alternativa a una célula anfitriona también pueden introducirse componentes individuales, es decir partes de ácido nucleico o fragmentos de un ácido nucleico según la invención de modo que la célula anfitriona resultante luego contenga un ácido nucleico según la invención o un vector según la invención. Este procedimiento es adecuado particularmente en el caso si la célula anfitriona ya contiene o varios componentes de un ácido nucleico según la invención o de un vector según la invención y los otros componentes se complementan luego de manera correspondiente. Los procedimientos para la transformación de células se encuentran establecidos en el estado de la técnica y son suficientemente conocidos por el especialista en la materia. Como células anfitrionas son adecuadas en principio todas las células, es decir células procariotas o eucariotas. Se prefieren aquellas células anfitrionas que pueden manejarse genéticamente de manera ventajosa, lo cual afecta, por ejemplo, la transformación con el ácido nucleico o el vector y su establecimiento estable, por ejemplo, hongos unicelulares o bacterias. Además, células anfitrionas preferidas se distinguen por una buena capacidad de manejo microbiológico o biotecnológico. Esto se refiere, por ejemplo, a una fácil capacidad de cultivo, altas tasas de crecimiento, bajos requisitos a los medios de fermentación y buenas tasas de producción y secreción para proteínas ajenas. Las células anfitrionas preferidas según la invención secretan la proteína expresada (transgénica) en el medio que rodea las células anfitrionas. Además, las proteasas pueden modificarse por las células que las producen después de su preparación, por ejemplo, mediante conexión de moléculas de azúcar, formilación, aminación, etc. Tales modificaciones pos-traslacionales pueden influir funcionalmente en la proteasa.

Otras formas preferidas de realización representan aquellas células anfitrionas que pueden regularse en su actividad debido a elementos de regulación genéticos que se proporcionan, por ejemplo, en el vector, pero que también pueden estar presentes desde el principio en estas células. A manera de ejemplo, mediante adición controlada de compuestos químicos que sirven como activadores, cambiando las condiciones de cultivo o al alcanzar determinada densidad celular, estas células anfitrionas pueden ser inducidas a la expresión. Esto hace posible una producción económica de las proteínas según la invención. Un ejemplo de un tal compuesto es IPTG, tal como se ha descrito antes.

Células anfitrionas preferidas son células procariotas o bacterianas. Las bacterias se caracterizan por tiempos breves de generación y bajas exigencias a las condiciones de cultivo. De esta manera pueden establecerse procedimientos de cultivo o procedimientos de preparación económicos. Además, el especialista en bacterias dispone de una rica experiencia en la técnica de fermentación. Para una producción especial, pueden ser adecuadas bacterias gram-negativas o gram-positivas por las más diversas razones a ser determinadas experimentalmente en cada caso individual, como fuente de nutrientes, tasas de formación de producto, el tiempo requerido, etc.

En el caso de bacterias gram-negativas tales como *Escherichia coli*, por ejemplo, se secreta una gran cantidad de proteínas en el espacio periplasmático, es decir en el compartimiento entre las dos membranas que encierran las células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Además, las bacterias gramnegativas también pueden configurarse de modo que descarguen las proteínas expresadas no sólo en el espacio periplasmático, sino en el medio que rodea la bacteria. Por el contrario, las bacterias gram-positivas como, por ejemplo, bacilos o actinomicetos u otros representantes de los actinomycetales no poseen membrana exterior, de modo que las proteínas secretadas se entregan inmediatamente al medio que rodea las bacterias, habitualmente el medio nutritivo, del cual pueden purificarse las proteínas expresadas. Estas pueden aislarse directamente del medio o seguir tratándose. Además, las bacterias gram-positivas están relacionadas con la mayoría de organismos de origen para enzimas industrialmente

importantes o son idénticas a estos y generalmente forman ellas mismas enzimas comparables de modo que disponen de un uso de codón similar y su aparato de síntesis de proteínas se alinea naturalmente de modo correspondiente.

Las células anfitrionas según la invención pueden modificarse con respecto a sus requerimientos a las condiciones de cultivo, puede tener otros marcadores de selección o adicionales o expresar todavía otras proteínas o adicionales. Principalmente también pueden ser células anfitrionas que expresan de manera transgénica varias proteínas o enzimas.

La presente invención es aplicable en principio a todos los microorganismos, principalmente a todos los microorganismos fermentables, de modo particularmente preferido a aquellos del género *Bacillus*, conduce a que gracias al empleo de tales microorganismos pueden producirse proteínas según la invención. Tales microorganismos representan entonces células anfitrionas en el sentido de la invención.

En otra forma de realización de la invención, la célula anfitriona se caracteriza porque es una bacteria, preferiblemente una que se selecciona del grupo de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, más preferiblemente una que se selecciona del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Sin embargo, la célula anfitriona también puede ser una célula eucariota que se caracterizan porque posee un núcleo celular. Otro objeto de la invención representa, por lo tanto, una célula anfitriona que se caracteriza porque posee núcleo celular. En contraste con las células procariotas, las células procariotas son capaces de modificar la proteína formada de modo post-traslacional. Ejemplos de estas son hongos tales como actinomicetos o levaduras tales como *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Esto puede ser particularmente ventajoso, por ejemplo, si en relación con su síntesis las proteínas deben experimentar modificaciones específicas que hacen posible los sistemas de este tipo. Las modificaciones que realizan los sistemas eucariotas particularmente en conexión con la síntesis de proteína incluyen, por ejemplo, el enlazamiento de compuestos de bajo peso molecular tales como anclas de membrana u oligosacáridos. Modificaciones de oligosacáridos de este tipo pueden ser deseables, por ejemplo, para disminuir la alergenicidad de una proteína expresada. También puede ser ventajosa una co-expresión con las enzimas formadas naturalmente por células de este tipo, tales como, por ejemplo, celulasas o lipasas. Además, a manera de ejemplo, pueden ser adecuados sistemas de expresión fúngicos termófilos principalmente para la expresión de proteínas o variantes resistentes a la temperatura.

Las células anfitrionas según la invención se cultivan y se fermentan de manera habitual, por ejemplo, en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso se inocula un medio nutriente adecuado con las células anfitrionas y el producto se cosecha del medio después de un período de tiempo que puede determinarse experimentalmente. Las fermentaciones continuas se caracterizan por lograr un equilibrio dinámico en el cual, al cabo de un lapso comparativamente largo, las células mueren parcialmente, pero también crecen de nuevo y al mismo tiempo puede retirarse la proteína formada del medio.

Células anfitrionas según la invención se usan preferiblemente para preparar proteasa según la invención. Otro objeto de la invención es, por lo tanto, un procedimiento para la preparación de una proteasa el cual comprende

- a) cultivar una célula anfitriona según la invención
- b) aislar la proteasa del medio de cultivo o de la célula anfitriona.

Este objeto de la invención comprende preferiblemente procedimientos de fermentación. Del estado de la técnica se conocen procedimientos de fermentación y representan la etapa de producción a escala industrial propiamente dicha, por lo regular seguida de un procedimiento de purificación apropiado del producto preparado, por ejemplo, de la proteasa según la invención. Todos los procedimientos de fermentación que se basan en un procedimiento correspondiente para la preparación de una proteasa según la invención representan formas de realización de este objeto de la invención.

Principalmente se toman en consideración procedimientos de fermentación que se caracterizan porque la fermentación se realiza por medio de una estrategia de suministro. En este caso, se suministran los componentes del medio que se consumen por el cultivo continuo. De esta manera pueden lograrse incrementos considerables, tanto en la densidad celular, como también en la masa celular o masa seca y/o principalmente en la actividad de la proteasa de interés. Además, la fermentación también puede configurarse de modo que se extraigan por filtración metabolitos no deseados o se neutralicen adicionando un regulador de pH o contra-iones apropiados.

La proteasa preparada puede cosecharse del medio de fermentación. Un procedimiento total de fermentación es preferible frente a un aislamiento de la proteasa de la célula anfitriona, es decir a una preparación de producto de la masa celular (masa seca), aunque requiere el suministro de células anfitrionas adecuadas o de uno o más marcadores

o mecanismos de secreción adecuados y/o sistemas de transporte, de modo que las células anfitrionas secreten la proteasa en el medio de fermentación. Sin secreción, de manera alternativa, la proteasa puede aislarse de la célula anfitriona, es decir que puede purificarse de la masa celular, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio o etanol, o mediante purificación cromatográfica.

Todos los hechos expuestos anteriormente pueden combinarse para producir proteasa según la invención.

Otro objeto de la invención es un producto que se caracteriza porque contiene una proteasa modificada según la invención, tal como se ha descrito antes. El producto es preferiblemente un detergente o un producto de limpieza. Puesto que las proteasas modificadas según la invención presentan desempeños de limpieza ventajosos, principalmente en el caso de manchas que contienen sangre o huevo entero, los productos son principalmente adecuados y ventajosos para eliminar tales manchas.

Este objeto de la invención incluye todos los tipos concebibles de detergentes y de productos de limpieza, así como concentrados y también productos que pueden aplicarse sin diluir para emplear a escala comercial, en las máquinas lavadoras o en el lavado o limpieza a mano. Estos incluyen, por ejemplo, detergentes para textiles, alfombras o fibras naturales, para los cuales se usa la denominación detergente. Estos también incluyen, por ejemplo, productos para lavar vajillas para máquinas lavavajillas o productos para lavar vajillas a mano o limpiadores para superficies duras tales como metal, vidrio, porcelana, cerámica, azulejos, piedra, superficies lacadas, plásticos, madera o cuero para los cuales se usa la denominación productos de limpieza; es decir que, además de los productos para lavar vajillas a mano y máquina, por ejemplo, también se cuentan productos abrasivos, limpiadores de vidrio, ambientadores de aseos, etc. Los detergentes y productos de limpieza en el marco de la invención incluyen, además, adyuvantes de lavado tales como se dosifican durante el lavado de textiles a mano o en máquina al detergente propiamente dicho para lograr otro efecto. Más aún, los detergentes y productos de limpieza en el marco de la invención también incluyen productos para el tratamiento previo y posterior de textiles, es decir aquellos productos con los cuales se pone en contacto la prenda que va a lavarse antes del lavado propiamente dicho, por ejemplo, para desprender suciedades persistentes y también aquellos productos que, en una de las etapas subsiguientes al lavado de textil propiamente dicho, confiere al producto que va lavarse otras propiedades deseables, tales como un tacto agradable, ausencia de arrugas o una pequeña carga estática. Entre los productos mencionados de último se incluyen, entre otros, los suavizantes.

La fracción en peso, referida a la proteína activa, de la proteasa según la invención en el peso total de los detergentes o productos de limpieza según la invención es preferentemente de 0,005 a 1,0 % en peso, preferentemente de 0,01 a 0,5 % en peso y principalmente de 0,02 a 0,2 % en peso. La concentración de proteína puede determinarse con ayuda de procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento BCA (ácido bicinconínico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de biureta (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), páginas 751-766). La determinación de la concentración de proteína activa se efectúa a este respecto por medio de una titulación de los centros activos usando un inhibidor irreversible adecuado (para proteasas, por ejemplo, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) y la determinación de la actividad residual (cf. M. Bender et al., J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), páginas 5890-5913).

Los detergentes o productos de limpieza según la invención pueden contener otras enzimas. Como otras enzimas pueden emplearse, por ejemplo, lipasas o cutinasas, principalmente debido a sus actividades disociado horas de triglicéridos, pero también para generar perácidos in situ a partir de precursores adecuados. Estos incluyen, por ejemplo, las lipasas que pueden obtenerse originalmente, o bien que hayan sido desarrolladas a partir de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*), principalmente aquellas con el intercambio de aminoácidos D96L. Estas incluyen, por ejemplo, las lipasas obtenidas originalmente o desarrolladas a partir de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*), principalmente aquellas con uno o varios de los siguientes intercambios de aminoácidos a partir de las lipasas mencionadas en las posiciones D96L, T213R y/o N233R., de modo particularmente preferido T213R y N233R. Además, pueden emplearse, por ejemplo, las cutinasas que hayan sido aisladas originalmente de *Fusarium solani pisi* y *Humicola insolens*. Además, también pueden emplearse lipasas o cutinasas, cuyas enzimas de partida originalmente han sido aisladas de *Pseudomonas mendocina* y *Fusarium solanii*.

Los productos según la invención también pueden contener celulasas o hemicelulasas tales como mananasas, xantanoliasas, pectiniasas (= pectinasas), pectinesterasas, pectatoliasas, xiloglucanasas (= xilanasas), pululananas o β -glucanasas.

Para incrementar el efecto blanqueador según la invención pueden emplearse oxidoreductasas, por ejemplo, oxidasas, oxigenasas, catalasas, peroxidasas tales como halo-, cloro-, bromo-, lignina-, glucosa- o manganeso-peroxidasas, dioxigenasas o laccasas (fenoloxidasas, polifenoloxidasas). De manera ventajosa, adicionalmente se agregan compuestos orgánicos, de modo particularmente preferido aromáticos, que interactúan con las enzimas para reforzar la actividad de las oxidoreductasas en cuestión (potenciadores) o, en caso de potenciales redox muy diferentes, para garantizar el flujo de electrones entre las enzimas que se oxidan y las manchas (mediadores).

Otras enzimas que también pueden emplearse son amilasas. Para las amilasas pueden usarse términos sinónimos como, por ejemplo, 1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa o glicogenasa. Amilasas preferidas según la invención son α -

amilasas. En el sentido de la invención, si una enzima es una α -amilasa es decisiva su capacidad para la hidrólisis de enlaces $\alpha(1-4)$ -glicosídicos en la amilosa del almidón.

Amilasas ejemplares son las α -amilasas de *Bacillus licheniformis*, de *Bacillus amiloliquefaciens* o de *Bacillus stearothermophilus* así como principalmente sus desarrollos mejorados para usar en detergentes o productos de limpieza. La enzima de *Bacillus licheniformis* se encuentra disponible en la empresa Novozymes bajo el nombre Termamyl® y en la empresa Danisco/Genencor bajo el nombre Purastar®ST. Productos de desarrollo de esta α -amilasa se encuentran disponibles en la compañía Novozymes bajo el nombre comercial Duramyl® y Termamil®ultra, en la compañía Danisco/Genencor bajo el nombre Purastar®OxAm y en la compañía Daiwa Seiko Inc., Tokyo, Japón, como Keistase®. La α -amilasa de *Bacillus amiloliquefaciens* es vendida por la compañía Novozymes bajo el nombre BAN®, y las variantes derivadas de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* bajo el nombre BSG® y Novamil®, igualmente en la compañía Novozymes. Además, para este propósito pueden resaltarse las α -amilasas de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) y la ciclodextrina-glucanotransferasa (CGTasa) de *Bacillus agaradherens* (DSM 9948). Igualmente, pueden emplearse productos de fusión de todas las moléculas mencionadas. Además, son adecuados los desarrollos de la α -amilasa de *Aspergillus niger* y *A. oryzae* que se encuentran disponibles bajo el nombre comercial Fungamyl® en la compañía Novozymes. Otros productos comerciales que pueden emplearse ventajosamente son, por ejemplo, la Amylase-LT® y Stainzyme® o Stainzyme Uultra® o Stainzyme plus®, estos últimos igualmente de la compañía Novozymes. Variantes de estas enzimas que pueden obtenerse mediante puntuaciones puntuales pueden emplearse según la invención. Amilasas particularmente preferidas se divulgan en las publicaciones de solicitudes internacionales de patente WO 00/60060, WO 03/002711, WO 03/054177 y WO07/079938, a cuya divulgación se hace referencia de manera expresa y cuyo contenido divulgado a este respecto se incorpora, por lo tanto, de manera expresa a la presente solicitud de patente.

La fracción en peso de las otras enzimas con respecto a la proteína activa en el peso total de los detergentes o productos de limpieza preferidos es de preferencia de 0,0005 a 1,0 % en peso, preferiblemente de 0,001 a 0,5 % en peso y principalmente de 0,002 a 0,2 % en peso.

Los detergentes o productos de limpieza pueden contener, además de los ingredientes antes descritos, sustancias activas para limpieza, en cuyo caso se prefieren sustancias del grupo de los tensioactivos, secuestrantes, polímeros, inhibidores de corrosión de vidrio, inhibidores de corrosión, fragancias y portadores de perfume. Estos ingredientes preferidos se describen a continuación más detalladamente.

Un componente preferido de los detergentes o productos de limpieza según la invención son los tensioactivos no iónicos, en cuyo caso se prefieren tensioactivos no iónicos de la fórmula general $R^1-CH(OH)CHO-(AO)_w-(A'O)_x-(A''O)_y-(A'''O)_z-R^2$, en la cual

- R^1 representa un residuo de alqueno o de alquilo de C_{6-24} de cadena recta o ramificado, saturado o mono- o poli-insaturado;

- R^2 representa un residuo de hidrocarburo lineal o ramificado que tiene 2 a 26 átomos de carbono;

- A, A', A'' y A''' independientemente entre sí representan un residuo del grupo $-CH_2CH_2$, $-CH_2CH_2-CH_2$, $-CH_2-CH(CH_3)$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$, $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2-CH(CH_2-CH_3)$,

- w, x, y y z representan valores 0,5 y 120, en donde x, y y/o z también pueden ser 0.

Adicionando los tensioactivos no iónicos antes mencionados de la fórmula general $R^1-CH(OH)CH_2O-(AO)_w-(A'O)_x-(A''O)_y-(A'''O)_z-R^2$, en lo sucesivo también denominados "éteres mixtos de hidroxilo", el rendimiento de limpieza de las preparaciones que contienen enzimas según la invención puede mejorarse ostensiblemente, más específicamente tanto en comparación con los sistemas sin tensioactivos, como también en comparación con los sistemas que contienen tensioactivos no iónicos alternativos, por ejemplo, del grupo de los alcoholes grasos polialcoxilados.

Gracias al empleo de estos tensioactivos no iónicos con uno o varios grupos hidroxilo libres en uno o ambos residuos de alquilo terminales, puede mejorarse ostensiblemente la estabilidad de las enzimas contenidas en las preparaciones detergentes o de productos de limpieza según la invención.

Principalmente se prefieren aquellos tensioactivos no iónicos poli(oxialquilados) cerrados con grupos terminales que, según la fórmula $R^1O[CH_2CH_2O]_xCH_2CH(OH)R^2$, además de un residuo R^1 , el cual representa un residuo de hidrocarburo lineales o ramificados, saturados o insaturados, alifáticos o aromáticos, con 2 a 30 átomos de carbono, de preferencia con 4 a 22 átomos de carbono, tienen además un residuo de hidrocarburo R^2 lineal o ramificado, saturado o insaturado, alifático o aromático, con 1 a 30 átomos de carbono, en donde x e representa valores entre 1 y 90, de preferencia valores entre 30 y 80 y principalmente valores entre 30 y 60.

Particularmente se prefieren tensioactivos de la fórmula $R^1O[CH_2CH(CH_3)O]_x[CH_2CH_2O]_yCH_2CH(OH)R^2$, en la cual R^1 representa un residuo de hidrocarburo lineal o ramificado, alifático, con 4 a 18 átomos de carbono o mezclas de los mismos, R^2 representa un residuo de hidrocarburo lineal o ramificado, con 2 a 26 átomos de carbono o mezclas de

los mismos, y x e representa valores entre 0,5 y 1,5 así como un valor de al menos 15. El grupo de estos tensioactivos no iónicos incluyen, por ejemplo, los ésteres 2-hidroxiálqulicos-(PO)1-(EO)15-40 de alcohol graso de C₂₋₂₆, principalmente también los éteres 2-hidroxideclicos-(PO)₁-(EO)₂₂ de alcohol graso de C₂₋₂₆.

Además, particularmente se prefieren aquellos tensioactivos no iónicos poli(oxialquilados) cerrados con grupos terminales, de la fórmula $R^1O[CH_2CH_2O]_x[CH_2CH(R^3)O]_yCH_2CH(OH)R^2$, en la cual R¹ y R² independientemente entre sí representan un residuo de hidrocarburo lineal o ramificado, saturado o mono- o poli-insaturado con 2 a 26 átomos de carbono, R³ independientemente uno de otro se selecciona de -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂-CH₃, -CH(CH₃)₂, aunque de preferencia representa -CH₃, y x e y representan independientemente entre sí valores entre 1 y 32, en cuyo caso muy particularmente se prefieren los tensioactivos no iónicos con R³ = -CH₃ y valores para x de 15 a 32 e y de 0,5 y 1,5.

Otros tensioactivos no iónicos que pueden emplearse preferiblemente son los tensioactivos no iónicos poli(oxialquilados) cerrados con grupos extremos de la fórmula $R^1O[CH_2CH(R^3)O]_x[CH_2]_kCH(OH)[CH_2]_jOR^2$, en la cual R¹ y R² representan residuos de hidrocarburo lineales o ramificados, saturados o insaturados, alifáticos o aromáticos, con 1 a 30 átomos de carbono, R³ representa H o un residuo de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, 2-butilo o 2-metil-2-butilo, x representa valores entre 1 y 30, k y j representan valores entre 1 y 12, de preferencia entre 1 y 5. Si el valor $x \geq 2$, cada R³ en la fórmula anterior $R^1O[CH_2CH(R^3)O]_x[CH_2]_kCH(OH)[CH_2]_jOR^2$ puede ser diferente. R¹ y R² son preferentemente residuo de hidrocarburo lineales o ramificados, saturados o insaturados, alifáticos o aromáticos, con 6 a 22 átomos de carbono, en cuyo caso particularmente se prefieren los residuos con 8 a 18 átomos de C. Para el residuo R³ particularmente se prefieren H, -CH₃ o -CH₂CH₃. Valores particularmente preferidos para x se encuentran en el intervalo de 1 a 20, principalmente de 6 a 15.

Tal como se ha descrito anteriormente, cada R³ en la fórmula anterior puede ser diferente, si $x \geq 2$. De esta manera puede variar la unidad de óxido de alquileo entre corchetes. Si x representa 3, por ejemplo, el residuo R³ puede seleccionarse para formar las unidades de óxido de etileno (R³ = H) o de óxido de propileno (R³ = CH₃), las cuales pueden unirse conjuntamente en cualquier secuencia, por ejemplo, (EO)(PO)(EO), (EO)(EO)(PO), (EO)(EO)(EO), (PO)(EO)(PO), (PO)(PO)(EO) y (PO)(PO)(PO). El valor 3 para x ácido seleccionado aquí a manera de ejemplo y puede ser fácilmente mayor, en cuyo caso la anchura de variación aumenta con valores de x crecientes y, por ejemplo, incluye una cantidad grande de grupos (EO), combinada con una cantidad baja de (PO), o viceversa.

Alcoholes poli(oxialquilados) cerrados con grupos terminales, particularmente preferidos, de la fórmula anterior presentan valores de k = 1 y j = 1, de modo que la fórmula anterior se simplifica a $R^1O[CH_2CH(R^3)O]_xCH_2CH(OH)CH_2OR^2$. En la fórmula mencionada de último, R¹, R² y R³ son tal como se han definido antes y x representa números de 1 a 30, de preferencia de 1 a 20 y principalmente de 6 a 18. Particularmente se prefieren tensioactivos en los cuales los residuos R¹ y R² presentan 9 a 14 átomos de C, R³ representa H y x asume valores de 6 a 15.

Finalmente, son particularmente efectivos los tensioactivos no iónicos de la fórmula general $R^1-CH(OH)CH_2O-(AO)_w-R_2$, en la cual

- R¹ representa un residuo de alqueno o de alquilo de C₆₋₂₄, de cadena recta o ramificado, saturado o mono- o poli-insaturado;

- R² representa un residuo de hidrocarburo lineal o ramificado con 2 a 26 átomos de carbono;

- A representa un residuo del grupo CH₂CH₂, -CH₂CH₂-CH₂, -CH₂-CH(CH₃), y

- w representa valores entre 1 y 120, de preferencia 10 a 80, principalmente 20 a 40. El grupo de estos tensioactivos no iónicos incluyen, por ejemplo, el éter 2-hidroxiálqulico-(EO)₁₀₋₈₀-alcohol graso de C₄₋₂₂, principalmente también el éter 2-hidroxideclico-(EO)₂₂₋₂-alcohol graso de C₈₋₁₂ y el éter 2-hidroxiálqulico-(EO)₄₀₋₈₀-alcohol graso de C₄₋₂₂.

Detergentes o productos de limpieza preferido se caracterizan porque el detergente o producto de limpieza contiene al menos un tensioactivo no iónico, de preferencia un tensioactivo no iónico del grupo de los éteres de hidroxilo mixtos, en cuyo caso la fracción en peso del tensioactivo no iónico en el peso total del detergente o producto de limpieza es de preferencia 0,2 a 10 % en peso, preferiblemente de 0,4 a 7,0 % en peso y principalmente de 0,6 a 6,0 % en peso.

Detergentes o productos de limpieza preferidos según la invención para el uso en procedimientos de lavado de vajillas en máquina contienen, además de los tensioactivos no iónicos antes descritos, otros tensioactivos, principalmente tensioactivos anfóteros. La fracción de tensioactivos aniónicos en el peso total de estos detergentes o productos de limpieza es, no obstante, preferentemente restringido. De esta manera, los productos lavavajillas para máquinas preferidos se caracterizan porque contienen, con respecto a su peso total, menos de 5, 0 % en peso, de preferencia menos de 3,0 % en peso, de modo particularmente preferido menos de 2,0 % en peso de tensioactivos aniónicos. Aquí se prescinde del empleo de tensioactivos aniónicos en una cantidad mayor principalmente para impedir un desarrollo excesivo de espuma.

Otro componente preferido de los detergentes o productos de limpieza según la invención son formadores de complejos. Formadores de complejos particularmente preferidos son los fosfonatos. Los fosfonatos que forman complejos comprenden, además del ácido 1-hidroxietan-1,1-difosfónico, una serie de diferentes compuestos como, por ejemplo, ácido dietilentriaminpenta(metilenfosfónico) (DTPMP). En esta solicitud principalmente se prefieren fosfonatos de hidroxialcano y de aminoalcano. Entre los fosfonatos de hidroxialcano tiene importancia particular el 1,1-difosfonato de 1-hidroxietano (HEDP) en calidad de co-secuestrante. Preferentemente se emplean en forma de sal de sodio, en cuyo caso la sal disódica reacciona de manera neutra y la sal tetrasódica reacciona de manera alcalina (pH 9). Como fosfonatos de aminoalcano se consideran preferentemente fosfonato de etilendiaminatetrametileno (EDTMP), fosfonato de dietilentriaminapentametileno (DTPMP), así como sus homólogos superiores. De esta manera, preferentemente se emplean en forma de las sales con reacción neutra, por ejemplo, en forma de sal hexasódica del EDTMP o bien en forma de sal hepta- y octa-sódica del DTPMP. Como secuestrantes en este caso se emplean de la clase de los fosfonatos, preferiblemente HEDP. Los fosfonatos de aminoalcano poseen, además, una capacidad pronunciada de enlazamiento de metales pesados. Por consiguiente, principalmente cuando los productos también contienen blanqueadores, puede preferirse emplear fosfonatos de aminoalcano, principalmente DTPMP, o usar mezclas de los fosfonatos mencionados.

Un detergente o producto de limpieza preferido en el contexto de esta solicitud contienen uno o varios fosfonatos del grupo de

- a) ácido aminotrimetilenfosfónico (ATMP) y/o sus sales;
- b) ácido etilendiamintetra(metilenfosfónico) (EDTMP) y/o sus sales;
- c) ácido dietilentriaminpenta(metilenfosfónico) (DTPMP) y/o sus sales;
- d) ácido 1-hidroxietan-1,1-difosfónico (HEDP) y/o sus sales;
- e) ácido 2-fosfonobutan-1,2,4-tricarboxílico (PBTC) y/o sus sales;
- f) ácido hexametilendiamintetra(metilenfosfónico) (HDTMP) y/o sus sales;
- g) ácido nitrilotri(metilenfosfónico) (NTMP) y/o sus sales.

Particularmente se prefieren los detergentes y productos de limpieza que contienen como fosfonatos al ácido 1-hidroxietan-1,1-difosfónico (HEDP) o el ácido dietilentriaminpenta(metilenfosfónico) (DTPMP). Los detergentes o productos de limpieza según la invención obviamente pueden contener dos o más fosfonatos diferentes. Detergentes o productos de limpieza preferidos según la invención se caracterizan porque el detergente o el producto de limpieza contiene al menos un formador de complejos del grupo de los fosfonatos, de preferencia 1,1-difosfonato de 1-hidroxietano, en cuyo caso la fracción en peso del fosfonato en el peso total del detergente o del producto de limpieza es preferentemente de 0,1 y 8,0 % en peso, preferiblemente de 0,2 y 5,0 % en peso y principalmente de 0,5 y 3,0 % en peso.

Los detergentes o productos de limpieza según la invención contienen además preferentemente un secuestrante. Los secuestrantes incluyen en este caso principalmente silicatos, aluminosilicatos (principalmente zeolitas), sales de ácidos di- y policarboxílicos orgánicos, así como mezclas de estas sustancias, de preferencia sustancias secuestrantes hidrosolubles, carbonatos, co-secuestrantes orgánicos, de preferencia sustancias secuestrantes hidrosolubles y, en donde no existan prejuicios psicológicos contra su empleo, también los fosfatos.

Entre la cantidad de fosfatos comercialmente disponibles, los fosfatos de metal alcalino tienen la mayor importancia para los productos según la invención, con preferencia particular de trifosfato pentasódico, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (trifosfato sódico) o tris fosfato pentapotásico, $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (tripolifosfato de potasio). Si en el contexto de la presente solicitud se emplean fosfatos como sustancias activas en la limpieza en el detergente o producto para limpieza, entonces los productos preferidos contienen este o estos fosfatos, de preferencia trifosfato pentapotásico, en donde la fracción en peso de fosfato en el peso total del detergente o producto de limpieza es preferentemente de 5,0 y 40 % en peso, preferiblemente de 10 y 30% en peso y principalmente 12 y 25 % en peso.

En una forma de realización particularmente preferida según la invención, en gran medida o completamente se prescinde del empleo de fosfatos (también de polifosfatos). El producto contiene en esta forma de realización preferentemente menos de 5 % en peso, de modo particularmente preferido menos de 3 % en peso, principalmente menos de 1 % en peso de fosfato(s). Particularmente se prefiere el producto en esta forma de realización lentamente libre de fosfatos, es decir que los productos contengan menos de 0,1 % en peso de fosfato(s).

Como co-secuestrantes orgánicos pueden mencionarse principalmente policarboxilatos / ácidos policarboxílicos, policarboxilatos poliméricos, ácido aspártico, poliacetales, dextrina, otros co-secuestrantes orgánicos, así como fosfonatos. Estas clases de sustancias se describen a continuación.

Secuestrantes orgánicos adecuados según la invención son, por ejemplo, los ácidos policarboxílicos que pueden emplearse en forma de sus sales de sodio (policarboxilatos), en cuyo caso por ácidos policarboxílicos se entienden aquellos ácidos carboxílicos que tienen más de una, principalmente dos a ocho funciones ácidas, preferiblemente de dos a seis, principalmente dos, tres, cuatro o cinco funciones ácidas en toda la molécula. Por lo tanto, como ácidos policarboxílicos se prefieren ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos, ácidos tetracarboxílicos y ácidos pentacarboxílicos, principalmente ácidos di-, tri- y tetracarboxílicos. En tal caso, los ácidos policarboxílicos pueden tener además otros grupos funcionales como, por ejemplo, grupos hidroxilo o amino. Por ejemplo, estos son ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácidos de azúcar (preferiblemente ácidos aldáricos, por ejemplo, ácido galactárico y ácido glucárico), ácidos aminocarboxílicos, principalmente ácidos aminodicarboxílicos, ácidos aminotricarboxílicos, ácidos aminotetracarboxílicos como, por ejemplo, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido glutamina-N,N-diacético (también denominado ácido N,N-bis(carboximetil)-L-glutámico o GLDA), ácido metilglicindiacético (MGDA) y sus derivados, así como mezclas de estos. Sales preferidas son las sales de los ácidos policarboxílicos como ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido tartárico, GLDA, MGDA y mezclas de estos. También adecuados como secuestrantes orgánicos son policarboxilatos poliméricos (polímeros orgánicos con una gran cantidad de (más de diez) funciones carboxilato en la macromolécula), poliaspartatos, poliactales y dextrinas. Las masas molares indicadas para policarboxilatos poliméricos en el sentido de esta publicación son masas molares promedio de peso Mw de la forma ácida respectiva que han sido determinadas fundamentalmente por medio de cromatografía de permeación en gel (GPC) en cuyo caso se ha empleado un detector de UV. La medición se efectúa en este caso frente a un estándar externo de poliácido acrílico, el cual proporciona valores de peso molar reales debido a su parentesco estructural con los polímeros estudiados. Estos datos se desvían ostensiblemente de los datos de peso molar en los cuales se emplean ácidos poliestirenosulfónicos como estándar. Las masas molares medidas frente a ácidos poliestirenosulfónicos son en general ostensiblemente más altas que las masas molares indicadas en esta publicación.

Polímeros adecuados son principalmente poliacrilatos que tienen preferiblemente una masa molecular de 2000 a 20000 g/mol. Debido a su solubilidad superior, los poliacrilatos de cadena corta que presentan masas molares de 2000 a 10000 g/mol, y de modo particularmente preferido de 3000 a 5000 g/mol, pueden ser a su vez los preferidos de este grupo.

Además, son adecuados policarboxilatos copoliméricos, principalmente aquellos del ácido acrílico con ácido metacrílico y del ácido acrílico o ácido metacrílico con ácido maleico particularmente adecuados han demostrado ser los copolímeros del ácido acrílico con ácido maleico que contienen 50 a 90 % en peso de ácido acrílico y 50 a 10 % en peso de ácido maleico. Su masa molecular relativa, con respecto a los ácidos libres, es en general de 2000 a 70000 g/mol, de preferencia 20000 a 50000 g/mol y principalmente de 30000 a 40000 g/mol.

Los oxidisuccinatos y otros derivados de los disuccinatos, de preferencia diamindisuccinato de etileno, también son otros co-secuestrantes adecuados. En tal caso se usa preferiblemente N,N'-disuccinato de etilendiamina (EDDS) preferiblemente en forma de sus sales de sodio o de magnesio. Además, en conexión con esto, también se prefieren disuccinatos de glicerina y trisuccinatos de glicerina.

Para mejorar el desempeño de lavado y/o para ajustar la viscosidad, los detergentes o los productos de limpieza preferidos contienen al menos un polímero modificado de modo hidrófugo, de preferencia polímero que contiene grupos de ácido carboxílico, modificado de modo hidrófugo, en cuyo caso la fracción en peso del polímero modificado de modo hidrófugo en el peso total del detergente o producto de limpieza es de preferencia de 0,1 a 10 % en peso, se encuentra preferiblemente entre 0,2 y 8,0 % en peso y principalmente 0,4 a 6,0 % en peso.

En adición a los secuestrantes descritos previamente, en el detergente o producto de limpieza pueden estar contenidos polímeros activos en limpieza. La fracción en peso de los polímeros activos en limpieza en el peso total de los detergentes o productos de limpieza en máquina según la invención es de preferencia de 0,1 a 20 % en peso, de preferencia 1,0 a 15 % en peso y principalmente de 2,0 a 12 % en peso.

Cómo polímeros activos en limpieza se emplean preferentemente polímeros que contienen grupos de ácido sulfónico, principalmente del grupo de los polisulfonatos copoliméricos. Estos polisulfonatos copoliméricos contienen, además de monómero (s) que contiene (n) grupos de ácido sulfónico, al menos un monómero del grupo de los ácidos carboxílicos insaturados.

Como ácido (s) carboxílico (s) insaturado (s) se emplea (n) con preferencia particular ácidos carboxílicos insaturados de la fórmula $R^1(R^2)C=C(R^3)COOH$, en la cual R^1 a R^3 representan, independientemente entre sí, -H, -CH₃, un residuo alquilo de cadena recta o ramificado con 2 a 12 átomos de carbono, un residuo alquilo de cadena recta o ramificada, mono- o poliinsaturado con 2 a 12 átomos de carbono, residuos de alquilo o alqueno sustituidos con -NH₂, -OH o -COOH, tal como se definen antes, o representan -COOH o -COOR⁴, en cuyo caso R⁴ es un residuo de hidrocarburo saturado o insaturado, de cadena recta o ramificado, con 1 a 12 átomos de carbono.

Ácidos carboxílicos insaturados particularmente preferidos son ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido etacrílico, ácido α-cloro acrílico, ácido α-cianoacrílico, ácido crotónico, ácido α-fenilacrílico, ácido maleico, anhídrido de ácido maleico,

ácido fumárico, ácido itacónico, ácido citracónico, ácido metilenomalónico, ácido sórbico, ácido cinámico o sus mezclas. Obviamente también pueden emplearse los ácidos dicarboxílicos insaturados.

En el caso de los monómeros que contienen grupos de ácido sulfónico se prefieren aquellos de la fórmula $R^5(R^6)C=C(R^7)-X-SO_3H$, en la cual R^5 a R^7 representa a independientemente entre sí -H, -CH₃, un residuo de alquilo de cadena recta o ramificado, insaturado, con 2 a 12 átomos de carbono, residuos de alquilo o de alqueno sustituidos con -NH₂, -OH o -COOH o representan -COOH o -COOR⁴, en donde R⁴ es un residuo de hidrocarburo saturado o insaturado, de cadena recta o ramificado, con 1 a 12 átomos de carbono, y X representa un grupo espaciador opcionalmente presente que se selecciona de -(CH₂)_n- con n = 0 a 4, -COO-(CH₂)_k- con k = 1 a 6, -C(O)-NH-C(CH₃)₂-, -C(O)-NHC(CH₃)₂-CH₂- y -C(O)-NH-CH(CH₂CH₃)-

Entre estos monómeros se prefieren aquellos de las fórmulas $H_2C=CH-X-SO_3H$, $H_2C=C(CH_3)-X-SO_3H$ y $HO_3S-X-(R^6)C=C(R^7)-X-SO_3H$, en las cuales R⁶ y R⁷ se seleccionan, de manera independiente entre sí, de -H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ y X representa un grupo espaciador opcionalmente presente que se selecciona de -(CH₂)_n- con n = 0 a 4, -COO-(CH₂)_k- con k = 1 a 6, -C(O)-NH-C(CH₃)₂-, -C(O)-NH-C(CH₃)₂-CH₂- y -C(O)-NH-CH(CH₂CH₃)-

Monómeros que contienen grupos de ácido sulfónico particularmente preferidos son en este caso ácido 1-acrilamido-1-propanosulfónico, ácido 2-acrilamido-2-propanosulfónico, ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, ácido 2-metacrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, ácido 3-metacrilamido-2-hidroxi-propanosulfónico, ácido alilosulfónico, ácido metalilosulfónico, ácido aliloxibencenosulfónico, ácido metaliloxibencenosulfónico, ácido 2-hidroxi-3-(2-propenilo)propanosulfónico, ácido 2-metil-2-propeno-1-sulfónico, ácido estirenosulfónico, ácido vinilosulfónico, acrilato de 3-sulfopropilo, metacrilato de 3-sulfopropilo, sulfometacrilamida, sulfometilmetacrilamida así como mezclas de los ácidos mencionados o sus sales hidrosolubles.

En los polímeros los grupos de ácido sulfónico pueden estar presentes total o parcialmente en forma neutralizada. El empleo de copolímeros que contienen grupos de ácido sulfónico parcial o totalmente neutralizados se prefiere según la invención.

La masa molar de los sulfo-copolímeros empleados preferiblemente según la invención puede variar para adaptar las propiedades de los polímeros al propósito de uso deseado. Productos lavavajillas para máquina se caracterizan porque los copolímeros tienen masas molares de 2000 a 200.000 g/mol⁻¹, de preferencia de 4000 a 25.000 g/mol⁻¹ y principalmente de 5000 a 15.000 g/mol⁻¹.

En otra forma preferida de realización, los polímeros comprenden, además del monómero que contiene grupos carboxilo y del monómero que contiene grupos de ácido sulfónico, además, al menos un monómero no iónico, de preferencia hidrófugo. Gracias al empleo de estos copolímeros modificados de manera hidrófuga fue posible mejorar principalmente el desempeño de enjuague de los productos para lavar vajillas en máquina según la invención.

Los detergentes o productos de limpieza que contienen un copolímero que comprende

i) monómero(s) que contienen grupos de ácido carboxílico

ii) monómero(s) que contienen grupos de ácido sulfónico

iii) monómero(s) no iónicos

se prefieren según la invención. Gracias al empleo de estos terpolímeros fue posible mejorar el desempeño de enjuague de los productos lavavajillas para máquina según la invención frente a productos lavavajillas comparables, que contenían sulfopolímeros sin adición de monómeros no iónicos.

Como monómeros no iónicos de preferencia se emplean monómeros de la fórmula general $R^1(R^2)C=C(R^3)-X-R^4$, en la cual R¹ a R³ representan, independientemente entre sí, -H, -CH₃ o -C₂H₅, X representa un grupo espaciador opcionalmente presente que se selecciona de -CH₂-, -C(O)O- y -C(O)-NH-, y R⁴ representa un residuo alquilo de cadena recta o ramificado, saturado, que tiene 2 a 22 átomos de carbono, o representa un residuo insaturado, de preferencia aromático, con 6 a 22 átomos de carbono.

Monómeros no iónicos particularmente preferidos son buteno, isobuteno, penteno, 3-metilbuteno, 2-metilbuteno, ciclopenteno, hexeno, hexeno-1, 2-metilpenteno-1, 3-metilpenteno-1, ciclohexeno, metilciclopenteno, ciclohepteno, metilciclohexeno, 2,4,4-trimetilpenteno-1, 2,4,4-trimetilpenteno-2, 2,3-dimetilhexeno-1, 2,4-dimetilhexeno-1, 2,5-dimetilhexeno-1, 3,5-dimetilhexeno-1, 4,4-dimetilhexeno-1, etilciclohexeno, 1-octeno, α-olefinas con 10 o más átomos de carbono como, por ejemplo, 1-deceno, 1-dodeceno, 1-hexadeceno, 1-octadeceno y C₂₂-α-olefina, 2-estireno, α-metilestireno, 3-metilestireno, 4-propilestireno, 4-ciclohexilestireno, 4-dodecilestireno, 2-etil-4-bencilestireno, 1-vinilnaftalina, 2-vinilnaftalina, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo, acrilato de butilo, acrilato de pentilo, acrilato de hexilo, metacrilato de metilo, N-(metil)acrilamida, acrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de 2-etilhexilo, N-(2-etilhexil)acrilamida, acrilato de octilo, metacrilato de octilo, N-(octil)acrilamida, acrilato de laurilo, metacrilato de laurilo,

N-(lauril)acrilamida, acrilato de arilo, metacrilato de arilo, N-(estearil)acrilamida, acrilato de behenilo, metacrilato de behenilo y N-(behenil)acrilamida o sus mezclas.

5 La fracción en peso de los copolímeros que contienen grupos de ácido sulfónico en el peso total de los detergentes o productos de limpieza según la invención es de preferencia 0,1 a 15 % en peso, de preferencia 1,0 a 12 % en peso y principalmente de 2,0 a 10 % en peso.

10 Los detergentes o productos de limpieza según la invención pueden presentarse en las formas de confección conocidas por el especialista; es decir, por ejemplo, en forma sólida o líquida, pero también como una combinación de formas de presentación sólidas y líquidas. Como forma de presentación sólida son adecuados principalmente los polvos, granulados, extrudidos o compactados, principalmente comprimidos. Las formas de presentación líquidas a base de agua y/o disolventes orgánicos pueden presentarse en forma expresada, en forma de geles.

15 Los detergentes o productos de limpieza según la invención se presentan preferentemente en forma líquida. Detergentes o productos de limpieza preferidos contienen, con respecto a su peso total, más de 40 % en peso, de preferencia entre 50 y 90 % en peso y principalmente entre 60 y 80 % en peso de agua.

20 Como otro componente, los detergentes o productos de limpieza según la invención pueden contener un disolvente orgánico. La adición de disolventes orgánicos tiene un efecto ventajoso en la estabilidad de las enzimas y el desempeño de limpieza de estos productos. Disolventes orgánicos preferidos provienen del grupo de alcoholes mono- o polihídricos, alcanolaminas o éteres glicólicos. Los disolventes se seleccionan preferentemente de etanol, n- o i-propanol, butanol, glicol, propano- o butanodiol, glicerina, di glicol, propil- o butildiglicol, hexilenglicol, éter metílico de etilenglicol, éter etílico de etilenglicol, éter propílico de etilenglicol, éter mono-n-butílico de etilenglicol, éter metílico de dietilenglicol, éter etílico de di-etilenglicol, éter metílico, etílico o propílico de propilenglicol, éter metílico o etílico de dipropilenglicol, metoxi-, etoxi- o butoxitriglicol, 1-butoxi-2-propanol, 3-metil-3-metoxibutanol, éter t-butílico de propilenglicol, así como mezclas de estos disolventes. La fracción en peso de estos disolventes orgánicos en el peso total de los detergentes o productos de limpieza según la invención es preferentemente de 0,1 a 10 % en peso, preferiblemente de 0,2 a 8,0 % en peso y principalmente de 0,5 a 5,0 % en peso. Un disolvente orgánico particularmente preferido y particularmente efectivo con respecto a la estabilización de los detergentes o productos de limpieza es la glicerina, así como el 1,2-propilenglicol. Según la invención se prefieren detergentes o productos de limpieza líquidos que contienen al menos un poliol, de preferencia del grupo de glicerina y 1,2-propilenglicol, en cuyo caso la fracción en peso del poliol en el peso total del detergente o producto de limpieza es de preferencia 0,1 y 10 % en peso, preferiblemente de 0,2 y 8,0 % en peso y principalmente de 0,5 y 5,0 % en peso. Otros disolventes orgánicos preferidos son las aminas orgánicas y alcanolaminas. Los detergentes o productos de limpieza según la invención contienen estas aminas de preferencia en cantidades de 0,1 a 10 % en peso, preferiblemente de 0,2 a 8,0 % en peso y principalmente de 0,5 a 5,0 % en peso, respectivamente con base en su peso total. Una alcanolamina particularmente preferida es la etanolamina.

40 Otro componente preferido de los detergentes o productos de limpieza según la invención es un alcohol de azúcar (alditol). El grupo de los alditos comprende polioles no cíclicos de la fórmula $\text{HOCH}_2[\text{CH}(\text{OH})]_n\text{CH}_2\text{OH}$. Los alditos incluyen, por ejemplo, manitol, isomaltitol, lactitol, sorbitol y xilitol, treitol, eritritol y arabitól como particularmente ventajoso con respecto a la estabilidad de la enzima se ha mostrado el sorbitol. La fracción en peso del alcohol de azúcar en el peso total del detergente o producto de limpieza es de preferencia de 1,0 a 10 % en peso, preferiblemente de 2,0 a 8,0 % en peso y principalmente de 3,0 a 6,0 % en peso. Detergentes o productos de limpieza líquidos según la invención se confeccionan de preferencia en forma polifásica, es decir mediante combinación de dos o más detergentes o productos de limpieza diferentes, separados entre sí. Este tipo de confección incrementa la estabilidad del detergente o producto de limpieza y mejora su desempeño de limpieza. Un detergente o producto de limpieza preferidos según la invención se caracteriza porque comprende un producto de embalaje y dos detergentes o productos de limpieza líquidos A y B, separados uno de otro, que se encuentran en este producto de embalaje, en cuyo caso la composición A contiene

a) al menos una proteasa modificada según la invención;

55 b) al menos otra enzima diferente de la proteasa según la invención,

c) 10 a 84,9 % en peso de secuestrante(s);

d) 15 a 89,9 % en peso de agua; y

60 la composición B contiene

e) 10 a 75 % en peso de secuestrante(s);

f) 25 a 90 % en peso de agua.

65

Otro objeto de la invención es un procedimiento para limpiar textiles o superficies duras, el cual se caracteriza porque en al menos una etapa procedimental se aplica un producto según la invención o porque en al menos una etapa procedimental se vuelve catalíticamente activa una proteasa según la invención, principalmente de modo que la proteasa se emplea en una cantidad de 40 µg a 4 g, de preferencia de 50 mg a 3 g, de modo particularmente preferido de 100 µg a 2 g y de modo muy particularmente preferido de 200 µg a 1 g.

Esto incluye procedimientos manuales y también mecánicos, en cuyo caso se prefieren procedimientos mecánicos. Los procedimientos para la limpieza de textiles se caracterizan en general porque en varias etapas procedimentales se aplican diferentes sustancias activas de limpieza sobre el producto que va a limpiarse y después de un tiempo de acción se lavan, o porque el producto que va a limpiarse se trata de otra manera con un detergente o una solución o dilución de este detergente. Algo correspondiente es válido para procedimientos para limpiar todos los otros materiales distintos de textiles, principalmente superficies duras. Todos los procedimientos de lavado o de limpieza concebibles pueden emplearse en al menos una de las etapas procedimentales mediante el uso de un detergente o producto de limpieza según la invención o de una proteasa según la invención y representan entonces formas de realización de la presente invención. Todos los hechos, objetos y formas de realización que se han descrito para las proteasas según la invención y los productos que las contienen también son aplicables a este objeto de la invención. Por lo tanto, en este sitio se hace referencia expresa a la divulgación en el lugar correspondiente con la nota de que esta divulgación también es válida para los procedimientos anteriores según la invención.

Puesto que las proteasas según la invención ya poseen naturalmente una actividad hidrolíticamente y estas se despliegan en medios que de otra manera no poseen poder de limpieza como, por ejemplo, en solo regulador de pH, una etapa individual y/o la única etapa de tal procedimiento puede consistir en que, en caso de desearse, como único componente activo para la limpieza se ponga en contacto una proteasa según la invención con el ensuciamiento, preferiblemente en una solución de regulador de pH o en agua. Esto representa otra forma de realización de un objeto de la invención.

Formas alternativas de realización de este objeto de la invención también representan procedimientos para el tratamiento de materias primas textiles o para el cuidado de textiles, en los cuales en al menos una etapa procedimental se vuelve activa una proteasa según la invención. Entre estas se prefieren procedimientos para materias primas textiles, fibras textiles con componentes naturales y muy particularmente para aquellas con lana o seda.

Otro objeto de la invención es el uso de un producto según la invención para limpiar textiles o superficies duras, o de una proteasa según la invención para limpiar textiles o superficies duras, principalmente de modo que la proteasa se emplee en una cantidad de 40 µg a 4 g, de preferencia de 50 µg a 3 g, de modo particularmente preferido de 100 µg a 2 g y de modo muy particularmente preferido de 200 µg a 1 g.

Todos los hechos, objetos y formas de realización que se han descrito para las proteasas según la invención y los productos que las contienen son aplicables también a este objeto de la invención. Por lo tanto, en este sitio se hace referencia expresa a la divulgación del sitio correspondiente, con la nota de que esta divulgación también se aplica para el uso anterior según la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, aunque sin restringirla a los mismos:

Todas las etapas de operación de biología molecular siguen procedimientos estándar tales como se indican en, por ejemplo, el Manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, u obras relevantes comparables. Se han empleado enzimas y kits según las indicaciones del fabricante respectivo.

Ejemplo 1

A partir de una proteasa que presentaba una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 1 se preparó una variante de proteasa según la invención por medio de mutagénesis direccionada al sitio ("site-directed") en el ácido nucleico que codifica para la proteasa por medio del "PHUSION Site-directed-Mutagenesis-Kit" (Finnzyme, F541). En este caso se modificaron los codones para las posiciones de aminoácidos indicadas de modo que, con respecto a la secuencia de aminoácidos se efectuó un intercambio de los aminoácidos, tal como se indica. La expresión de la variante de proteasa se efectuó de una manera habitual mediante transformación de *Bacillus licheniformis*, con un vector de expresión correspondiente y un cultivo subsiguiente de los transformantes que expresan la variante de proteasa.

Variantes de proteasa 1 [SEQ ID NO. 4]: Proteasa con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 1 con la sustitución de aminoácidos N97D en el recuento según SEQ ID NO. 1;

Variantes de proteasa 2 [SEQ ID NO. 5]: Proteasa con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 1 con la sustitución de aminoácidos R99E en el recuento según SEQ ID NO. 1;

Variantes de proteasa 3 [SEQ ID NO. 6]: Proteasa con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 1 con las sustituciones de aminoácidos N97D y R99E en el recuento según SEQ ID NO. 1;

Ejemplo 2: Estudio de las variantes 1 a 3 a escala de laboratorio

Las variantes de proteasa 1 a 3 [SEQ ID NO. 4, 5 y 6] se produjeron en fermentadores pequeños de laboratorio según procedimientos estándar.

Las proteasas se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico a partir de los sobrenadantes de fermentación y se determinó el contenido de proteína activa de las muestras resultantes, así como la actividad específica por medio de titulación de los centros activos. De manera correspondiente se procedió con el tipo silvestre [SEQ ID NO. 1], así como con la proteasa de referencia [SEQ ID NO. 3].

Se efectuó un primer ensayo de lavado a una escala de 48 pozos con base en los datos determinados se lavó con la misma proteína activa a 40 °C en una formulación de cribado similar a la comercial. Se lograron los siguientes resultados:

	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6
10N	4,2	6	7,7	5,9	8,3
C-05	6,2	6,7	7,8	6,5	7,4

Se muestra que la mutación en la posición 97 conduce a un desempeño mejorado de lavado y la combinación con la mutación en posición 99 hace posible parcialmente un mejoramiento adicional.

Para este ejemplo se emplearon textiles ensuciados estandarizados. Se usaron los siguientes ensuciamientos:

- Sangre-leche/tinta sobre algodón: producto No. C-05 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos y

- Huevo entero/pigmento sobre algodón: producto No. 10N disponible en von wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, Alemania.

Ejemplo 3: Estudio de las variantes 1 a 3 en la máquina de lavar

Las variantes de proteasa 1 a 3 [SEQ ID NO. 4, 5 y 6] así como el tipo silvestre [SEQ ID NO. 1] se lavaron en la máquina de lavar de modo comparativo.

Se empleó respectivamente la misma cantidad de enzima activa.

Las proteasas se dosificaron encima (on top) a un detergente líquido acuoso (que además de agua contenía 5,5 % en peso de alcohol graso de C12/14 7-veces etoxilado, 5,3 % en peso de sulfonato de alquilbenceno de C9-13 de sodio, 4,9 % en peso de étersulfato de alcohol graso de C12/14 de sodio con 2 EO, 1,8 % en peso de ácido cítrico, 3 % en peso de ácido graso de C12-18, 0,1 % en peso de sal hepta- sódica de ácido dietilentriaminpenta(metilenfosfónico), 1,3 % en peso de NaOH, 3,6 % en peso de etanol/glicerina) con pH 8,5 sin proteasa y se lavó a 40°C, dureza de agua 16°dH, en una máquina Miele W 1935, tiempo total de lavado 2 h 15 min.

Se realizó una determinación de seis veces y se lavaron diferentes monitores de ensuciamiento y se midieron después de lavar usando un colorímetro.

Se obtuvieron los siguientes valores de Y en comparación con el tipo silvestre [SEQ ID NO. 1]:

	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6
01. EMPA 111 [CO]	3,1	1,6	9,9
03. CFT C05 [CO]	1,9	2,2	5,1
05. WFK 10EG [CO]	0,2	0,7	1,2
09. H-MR-B [CO]	7,4	4,2	8,4
10. EMPA 165 [CO]	0,8	0,9	1,4

Para este ejemplo también se emplearon textiles ensuciados estandarizados. Se usaron los siguientes ensuciamientos:

- Sangre sobre algodón; producto No. 111, disponible en la compañía Eidgenössische Material- y Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, San Galo, Suiza.

- Sangre-leche/tinta sobre algodón: producto No. C-05 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos y

• Yema de huevo sobre algodón: producto No. 10EG disponible en wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, Alemania.

5 • Tejidos de ensayo empleados ensuciados con suciedad estándar, de fabricación propia de la solicitante: algodón, no terminado, ensuciado con leche – hollín (H-MR-B)

• Pudín de chocolate sobre algodón; producto No. 165, disponible en la compañía Eidgenössische Material- y Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, San Galo, Suiza.

10 Se reconoce claramente que ante todo la mutación R99E (en la variante 2, SEQ ID NO. 5) o la combinación R99E y N97D (en la variante 3, SEQ ID NO. 6) proporcionan desempeños de lavado muy ventajosos en comparación con su tipo silvestre [SEQ ID NO. 1].

15 **Ejemplo 4:** Estudio de las variantes 1 a 3 (SEQ ID NO. 4, 5, 6) en la máquina lavavajillas

Se usó un producto lavavajillas automático libre de fosfato en forma de un comprimido de producto lavavajillas. El peso del comprimido se encontraba en 19 g. La matriz del producto lavavajillas poseía la siguiente composición:

20 calculada sobre 20 g de comprimido

Materias primas	Interválos de fórmula			
	total % g / trabajo			
Na-Citrato	15,00	20,00	3,00	4,000
Fosfonato (HEDP)	2,50	7,50	0,50	1,500
MGDA	0,00	25,00	0,00	5,000
Na-disilicato	5,00	35,00	1,00	7,000
Sosa	12,50	25,00	2,50	5,000
Na-percarbonato	10,00	15,00	2,00	3,000
Catalizador de blanqueo (a base de Mn)	0,02	0,50	0,003	0,100
TAED	2,00	3,00	0,40	0,600
Tensioactivo no iónico 20-40EO tapa terminal mgl.	2,50	10,00	0,50	2,000
Policarboxilato	5,00	10,00	1,00	2,000
Copolímero catiónico	0,25	0,75	0,05	0,150
PVP reticulado – desintegrante	0,00	1,50	0,00	0,300
Proteasa	1,50	5,00	0,30	1,000
Amilasa	0,50	3,00	0,10	0,600
Benzotriazol (protección de plata)	0,00	0,50	0,00	0,100
Perfume	0,05	0,15	0,01	0,030
Solución de color	0,00	1,00	0,00	0,200
Zn-Acetato	0,10	0,30	0,02	0,060
Na-sulfato	0,00	25,00	0,00	5,000
Agua	0,00	1,50	0,00	0,300
Regulador de pH (ácido cítrico)	1,00	1,50	0,20	0,300
Adyuvante de procedimiento	0,00	5,00	0,00	1,000
	57,92	196,20	11,6	39,24

El desempeño de lavado describe la capacidad de un producto lavavajillas, principalmente un producto lavavajillas mecánico, de eliminar parcial o completamente un ensuciamiento presente.

25 El desempeño de lavado del producto se ensayó sobre tres ensuciamientos diferentes. Al producto empleado se agregaron respectivamente las variantes de proteasa según la invención de acuerdo con SEQ ID NOs. 4, 5 o 6, o en calidad de referencia la proteasa con la SEQ ID NO.1.

30 El procedimiento para lavar vajillas se realizó en la máquina lavavajillas Miele GSL (programa: 45°C, 8 minutos tiempo de permanencia, dureza de agua 21° de dureza alemana) según la norma IKW. El comprimido de producto lavavajillas se puso antes del inicio del programa de limpieza en el dispositivo dosificador.

La evaluación del desempeño de limpieza se efectuó visualmente según una escala de 1 a 10, en donde el valor 10 es la mejor nota (sin residuo reconocible). Se efectuaron 3 repeticiones respectivamente con 6 réplicas internas por máquina. Los resultados indicados en las tablas 1 y 2 son el valor medio de la determinación múltiple.

5

Tabla 1:

Variante de proteasa	Té Assam	Té BOP	Espagueti
SEQ ID NO.1	2,3	3,3	3,8
SEQ ID NO.4	3,0	4,0	3,9
SEQ ID NO.5	2,7	4,4	3,5

10 Tal como puede reconocerse de la tabla 1, el uso de las variantes de proteasa según SEQ ID NO.4 y 5 conduce a un mejoramiento del desempeño de limpieza, principalmente sobre manchas de té.

Tabla 2:

Variante de proteasa	Té Assam	Té BOP	Espagueti
SEQ ID NO.1	1,6	3,2	1,3
SEQ ID NO.6	2,0	3,4	3,1

15 Tal como puede reconocerse de la tabla 2, el uso de la variante de proteasa según SEQ ID NO.6 tanto sobre manchas de té, como también principalmente sobre manchas de espagueti, conduce a un mejoramiento del desempeño de limpieza.

(Listado de secuencias)

20 <110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Variantes de proteasa con desempeño de lavado mejorado

<130> PT032381

25 <150> 102014224825.6

<151> 2014-12-04

30 <160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

35 <211> 269

<212> PRT

40 <213> bacillus gibsonii (dsm 14391)

<400> 1

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

ES 2 758 992 T3

				165						170					175
Asn	Asn	Arg	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Gln	Tyr	Gly	Thr	Gly	Ile	Asp	Ile
			180					185					190		
Val	Ala	Pro	Gly	Val	Gly	Ile	Gln	Ser	Thr	Tyr	Leu	Asn	Asn	Ser	Tyr
		195					200					205			
Ala	Ser	Met	Pro	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Val
	210					215					220				
Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	Asn	Pro	Ser	Trp	Asn	Ala	Thr	Gln	Ile
225					230					235					240
Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Asn	Leu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln
				245					250					255	
Phe	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Arg			
			260					265							

<210> 2

5 <211> 374

<212> PRT

<213> Bacillus sp. DSM 14392

10 <400> 2

ES 2 758 992 T3

Met Gly Lys Ile Val Ala Gly Thr Ala Leu Ile Ile Ser Val Ala Phe
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ile Ala Gln Ala Ala Glu Glu Ala Lys Glu Lys Tyr Leu
20 25 30

Ile Gly Phe Lys Glu Gln Glu Val Met Ser Gln Phe Val Asp Gln Ile
35 40 45

Asp Gly Asp Glu Tyr Ser Ile Ser Ser Gln Ala Glu Asp Val Glu Ile
50 55 60

Asp Leu Leu His Glu Phe Asp Phe Ile Pro Val Leu Ser Val Glu Leu
65 70 75 80

Asp Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp Pro Ala Ile Ala Tyr
85 90 95

Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Gln Thr Val Pro Trp Gly
100 105 110

Ile Asn Arg Val Gln Ala Pro Ile Ala Gln Ser Arg Gly Phe Thr Gly

115	120	125													
Thr	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Gly	Ile	Ser	Asn	His	Ala
130						135					140				
Asp	Leu	Arg	Ile	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Glu	Pro	Asn
145					150					155					160
Ile	Ser	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala
				165					170					175	
Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Asn	Val	Asp
			180					185					190		
Leu	Tyr	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ile	Ser
		195					200					205			
Gly	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Ala	Ala	Asn	Asn	Gly	Met	His	Ile
210						215					220				
Ala	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Met	Glu	Gln
225					230					235					240
Ala	Val	Asn	Gln	Ala	Thr	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser
				245					250					255	
Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Gly	Asn	Val	Gly	Phe	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn
			260					265					270		
Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln	Asn	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe
	275						280					285			
Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Pro	Gly	Val	Gly	Val
	290					295					300				
Gln	Ser	Thr	Val	Pro	Gly	Asn	Gly	Tyr	Ala	Ser	Phe	Asn	Gly	Thr	Ser
305					310					315					320
Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys
				325					330					335	
Asn	Pro	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Gln	Ile	Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr
			340					345					350		
Ala	Thr	Asn	Leu	Gly	Asn	Thr	Thr	Gln	Phe	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn
	355						360					365			

Ala Glu Ala Ala Thr Arg
370

<210> 3

5 <211> 269

<212> PRT

10 <213> Bacillus lentus

<400> 3

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

ES 2 758 992 T3

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

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

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

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

<210> 4

5 <211> 269

<212> PRT

<213> bacillus gibsonii (dsm 14391)

10

<400> 4

ES 2 758 992 T3

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

ES 2 758 992 T3

```

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
      165                      170                      175

Asn Asn Arg Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile
      180                      185                      190

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

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

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

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Asp Ala Ala Thr Arg
      260                      265

```

<210> 5

5 <211> 269

<212> PRT

<213> bacillus gibsonii (dsm 14391)

10

<400> 5

ES 2 758 992 T3

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Thr Val
1 5 10 15

His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Ile Leu Asp
20 25 30

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

Phe Val Pro Gly Glu Ser Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50 55 60

His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
85 90 95

Asn Gly Glu Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
100 105 110

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
115 120 125

Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Gly
130 135 140

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

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
165 170 175

Asn Asn Arg Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile
180 185 190

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

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

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

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Asp Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 6

5 <211> 269

<212> PRT

<213> bacillus gibsonii (dsm 14391)

10

<400> 6

ES 2 758 992 T3

Gln	Gln	Thr	Val	Pro	Trp	Gly	Ile	Thr	Arg	Val	Gln	Ala	Pro	Thr	Val
1				5					10					15	
His	Asn	Arg	Gly	Ile	Thr	Gly	Ser	Gly	Val	Lys	Val	Ala	Ile	Leu	Asp
			20					25					30		
Thr	Gly	Ile	Ala	Gln	His	Ser	Asp	Leu	Thr	Ile	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser
		35					40					45			
Phe	Val	Pro	Gly	Glu	Ser	Thr	Thr	Ala	Asp	Leu	Asn	Gly	His	Gly	Thr
	50					55					60				

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

<210> 7

5 <211> 374

<212> PRT

<213> Bacillus sp. DSM 14392

10

<400> 7

ES 2 758 992 T3

Met Gly Lys Ile Val Ala Gly Thr Ala Leu Ile Ile Ser Val Ala Phe
1 5 10 15

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

ES 2 758 992 T3

Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe
275 280 285

Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Gly Val
290 295 300

Gln Ser Thr Val Pro Gly Asn Gly Tyr Ala Ser Phe Asn Gly Thr Ser
305 310 315 320

Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Val Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys
325 330 335

Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr
340 345 350

Ala Thr Asn Leu Gly Asn Thr Thr Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn
355 360 365

Ala Glu Ala Ala Thr Arg
370

<210> 8

5 <211> 374

<212> PRT

<213> Bacillus sp. DSM 14392

10

<400> 8

ES 2 758 992 T3

Met	Gly	Lys	Ile	Val	Ala	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Ile	Ser	Val	Ala	Phe
1				5					10					15	
Ser	Ser	Ser	Ile	Ala	Gln	Ala	Ala	Glu	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Tyr	Leu
			20					25					30		
Ile	Gly	Phe	Lys	Glu	Gln	Glu	Val	Met	Ser	Gln	Phe	Val	Asp	Gln	Ile
		35					40						45		
Asp	Gly	Asp	Glu	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Glu	Ile
	50					55					60				
Asp	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Leu	Ser	Val	Glu	Leu
65					70					75					80
Asp	Pro	Glu	Asp	Val	Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Asp	Pro	Ala	Ile	Ala	Tyr
				85					90					95	
Ile	Glu	Glu	Asp	Ala	Glu	Val	Thr	Thr	Met	Gln	Thr	Val	Pro	Trp	Gly
			100					105					110		

Ile	Asn	Arg	Val	Gln	Ala	Pro	Ile	Ala	Gln	Ser	Arg	Gly	Phe	Thr	Gly	115	120	125	
Thr	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Gly	Ile	Ser	Asn	His	Ala	130	135	140	
Asp	Leu	Arg	Ile	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Glu	Pro	Asn	145	150	155	160
Ile	Ser	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	165	170	175	
Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Asn	Val	Asp	180	185	190	
Leu	Tyr	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Ile	Ser	195	200	205	
Gly	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Ala	Ala	Asn	Asn	Gly	Met	His	Ile	210	215	220	
Ala	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Met	Glu	Gln	225	230	235	240
Ala	Val	Asn	Gln	Ala	Thr	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	245	250	255	
Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Gly	Asn	Val	Gly	Phe	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn	260	265	270	
Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln	Asn	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	275	280	285	
Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Pro	Gly	Val	Gly	Val	290	295	300	
Gln	Ser	Thr	Val	Pro	Gly	Asn	Gly	Tyr	Ala	Ser	Phe	Asn	Gly	Thr	Ser	305	310	315	320
Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	325	330	335	
Asn	Pro	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Gln	Ile	Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr	340	345	350	
Ala	Thr	Asn	Leu	Gly	Asn	Thr	Thr	Gln	Phe	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	355	360	365	

ES 2 758 992 T3

Ala Glu Ala Ala Thr Arg
370

<210> 9

5 <211> 374

<212> PRT

10 <213> Bacillus sp. DSM 14392

<400> 9

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

Gly	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Ala	Ala	Asn	Asn	Gly	Met	His	Ile
210						215					220				
Ala	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Met	Glu	Gln
225					230					235					240
Ala	Val	Asn	Gln	Ala	Thr	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser
				245					250					255	
Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Gly	Asn	Val	Gly	Phe	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn
			260					265					270		
Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln	Asn	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe
		275					280					285			
Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Pro	Gly	Val	Gly	Val
	290					295					300				
Gln	Ser	Thr	Val	Pro	Gly	Asn	Gly	Tyr	Ala	Ser	Phe	Asn	Gly	Thr	Ser
305					310					315					320
Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys
				325					330					335	
Asn	Pro	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Gln	Ile	Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr
			340					345					350		
Ala	Thr	Asn	Leu	Gly	Asn	Thr	Thr	Gln	Phe	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn
		355					360					365			
Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg										
370															

REIVINDICACIONES

1. Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 en toda su longitud en al menos 90% y de manera cada vez más preferida en al menos 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% y 99% y en el recuento según SEQ ID NO. 1 en la posición 97 presenta el aminoácido D y/o en la posición 99 el aminoácido E, en cuyo caso la proteasa presenta un desempeño mejorado de limpieza en comparación con una proteasa según SEQ ID NO. 1.
2. Proteasa según la reivindicación 1, caracterizada porque presenta una o varias sustituciones de aminoácidos en el recuento según SEQ ID NO. 1, las cuales se seleccionan de N97D y R99E.
3. Proteasa según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque su secuencia de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO. 4 a SEQ ID NO. 6.
4. Procedimiento para la preparación de una proteasa que comprende la introducción de una sustitución de aminoácido N97D y/o R99E en el recuento según SEQ ID NO. 1 en una proteasa de partida que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 por toda su longitud en al menos 90% y de modo cada vez más preferido en al menos 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% y 99%, en cuyo caso la proteasa presenta un desempeño mejorado de limpieza en comparación con una proteasa según SEQ ID NO. 1.
5. Ácido nucleico que codifica para una proteasa según una de las reivindicaciones 1 a 3 o que codifica para una proteasa que puede obtenerse según un procedimiento de la reivindicación 4.
6. Vector que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 5, principalmente un vector de clonación o un vector de expresión.
7. Célula no humana que incluye un ácido nucleico según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6, o la cual incluye una proteasa según una de las reivindicaciones 1 a 3, o la cual incluye una proteasa obtenida según un procedimiento de la reivindicación 4, principalmente una que secreta la proteasa en el medio que rodea la célula anfitriona.
8. Procedimiento para la preparación de una proteasa que comprende
 - a) cultivar una célula anfitriona según la reivindicación 7
 - b) aislar la proteasa del medio de cultivo o de la célula anfitriona.
9. Producto, principalmente un detergente o producto de limpieza caracterizado porque contiene al menos una proteasa según una de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteasa que puede obtenerse según un procedimiento de la reivindicación 4, principalmente en una cantidad de 2 µg a 20 mg por g del producto.