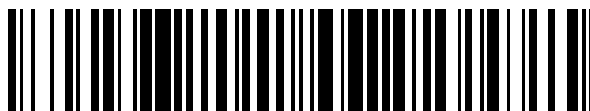


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 815**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2006** **E 11165353 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2390321**

54 Título: **Uso y producción de metaloproteasa neutra estable en el almacenamiento**

30 Prioridad:

12.10.2005 US 726448 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2015

73 Titular/es:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (50.0%)
IP Department One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US y
DANISCO US INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

SHAW, ANDREW;
WALLACE, LOUISE;
ESTELL, DAVID A.;
LEE, SANG-KYU;
SADLOWSKI, EUGENE STEVEN;
OH, HIROSHI y
HOMMES, RONALD

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 529 815 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

Uso y producción de metaloproteasa neutra estable en el almacenamiento

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 **[0001]** La presente invención proporciona una enzima de metaloproteasa neutra que presenta una actividad o estabilidad mejorada. En algunas formas de realización, la metaloproteasa neutra se utiliza en aplicaciones que incluyen, sin carácter limitativo, limpieza, blanqueo y desinfección.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 **[0002]** Normalmente, los detergentes y otras composiciones limpiadoras incluyen una combinación compleja de ingredientes activos. Por ejemplo, la mayoría de productos de limpieza incluyen un sistema tensioactivo, enzimas para limpiar, agentes de blanqueo, adyuvantes, supresores de jabonaduras, agentes de suspensión de la suciedad, agentes de liberación de la suciedad, blanqueadores ópticos, suavizantes, dispersantes, compuestos inhibidores de la transferencia de tinte, abrasivos, bactericidas y perfumes. A pesar de la complejidad de los detergentes actuales, hay muchas manchas que son difíciles de eliminar por completo. Asimismo, a menudo se acumulan residuos, lo que da lugar a decoloración (por ejemplo, amarilleamiento) y a una reducción de la estética debido a una limpieza incompleta. Estos problemas se ven agravados por el aumento del uso de temperaturas de lavado bajas (por ejemplo, agua fría) y ciclos de lavado más cortos. Asimismo, muchas manchas están compuestas por mezclas complejas de material fibroso, que fundamentalmente incorporan carbohidratos y derivados de carbohidratos, fibra y componentes de la pared celular (por ejemplo, material vegetal, madera, suciedad a base de lodo/arcilla y fruta). Dichas manchas plantean retos difíciles a la formulación y uso de composiciones limpiadoras.

20 **[0003]** Además, las prendas coloreadas tienden a desgastarse y a mostrar empeoramientos del aspecto. Parte de esta pérdida de color se debe a la abrasión en el proceso de colada, sobre todo en lavadoras y secadoras automáticas. Asimismo, la pérdida de fuerza tensil de la tela parece ser un resultado inevitable de la acción mecánica y química debido al uso, desgaste y/o lavado y secado. Por consiguiente, es necesario un medio para lavar de manera eficaz y efectiva prendas coloreadas de modo que se minimicen dichos empeoramientos del aspecto.

30 **[0004]** En resumen, a pesar de las mejoras de las capacidades de las composiciones limpiadoras, persiste la necesidad en la técnica de detergentes que eliminen manchas, mantengan el color y aspecto de la tela y eviten la transferencia de tinte. Asimismo, persiste la necesidad de composiciones detergentes y/o de cuidado de la tela que proporcionen y/o devuelvan la fuerza tensil, que proporcionen también a la tela propiedades antiarrugas, antiapelotonamiento y/o antiencogimiento, que además proporcionen un control de la estática, suavidad a la tela, que mantengan el aspecto de color deseado y las propiedades y ventajas antidesgaste de la tela. En concreto, persiste la necesidad de incluir composiciones que sean capaces de eliminar los componentes coloreados de las manchas, que a menudo se quedan unidos a la tela que se lava. Asimismo, persiste la necesidad de métodos y composiciones mejorados adecuados para el blanqueo textil.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

40 **[0005]** La invención proporciona una variante de metaloproteasa neutra aislada que presenta al menos un 70 % de identidad de aminoácidos con la metaloproteasa neutra, comprendiendo la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:18 y presentando una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una mutación equivalente a una mutación de una metaloproteasa neutra que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:18, donde dichas mutaciones se seleccionan entre T004C, T004E, T004H, T004I, T004K, T004L, T004M, T004N, T004P, T004R, T004S, T004V, T004W, T004Y, G012D, G012E, G012I, G012K, G012L, G012M, G012Q, G012T, G012V, G012W, K013C, K013D, K013E, K013F, K013G, K013H, K013I, K013L, K013M, K013N, K013Q, K013S, K013T, K013V, K013Y, T014F, T014G, T014H, T014I, T014K, T014L, T014M, T014P, T014Q, T014R, T014S, T014V, T014W, T014Y, S023A, S023D, S023F, S023I, S023K, S023L, S023M, S023N, S023P, S023Q, S023R, S023T, S023V, S023W, S023Y, G024A, G024D, G024F, G024G, G024H, G024I, G024K, G024L, G024M, G024N, G024P, G024R, G024S, G024T, G024V, G024W, G024Y, K033H, Q045C, Q045D, Q045E, Q045F, Q045H, Q045I, Q045K, Q045L, Q045M, Q045N, Q045P, Q045R, Q045T, Q045W, N046A, N046C, N046E, N046F, N046G, N046H, N046I, N046L, N046M, N046N, N046P, N046Q, N046R, N046S, N046T, N046V, N046W, N046Y, R047E, R047K, R047L, R047M, R047Q, R047S, R047T, Y049A, Y049C, Y049D, Y049E, Y049F, Y049H, Y049I, Y049K, Y049L, Y049N, Y049R, Y049T, Y049V, Y049W, N050D, N050F, N050G, N050H, N050I, N050K, N050L, N050M, N050P, N050Q, N050W, N050Y, T054C, T054D, T054E, T054F, T054G, T054H, T054I, T054K, T054L, T054M, T054N, T054P, T054Q, T054R, T054S, T054V, T054W, T054Y, S058D, S058H, S058I, S058L, S058N, S058P, S058Q, T059A, T059C, T059E, T059G, T059H, T059I, T059K, T059L, T059M, T059N, T059P, T059Q, T059R, T059S, T059V, T059W, T060D, T060F, T060I, T060K, T060L, T060N, T060Q, T060R, T060V, T060W, T060Y, T065C, T065E, T065F, T065H, T065I, T065K, T065L, T065M, T065P, T065Q, T065R,

T065V, T065Y, S066C, S066D, S066E, S066F, S066H, S066I, S066K, S066L, S066N, S066P, S066Q, S066R, S066T, S066V, S066W, S066Y, Q087A, Q087D, Q087E, Q087H, Q087I, Q087K, Q087L, Q087M, Q087N, Q087R, Q087T, Q087V, Q087W, N090C, N090D, N090E, N090F, N090G, N090H, N090L, N090R, N090T, N096G, N096H, N096K, N096R, K097H, K097Q, K097W, K100A, K100D, K100E, K100F, K100H, K100N, K100P, K100Q, K100R, K100S, K100V, K100Y, R110A, R110C, R110E, R110H, R110K, R110L, R110M, R110N, R110S, R110Y, D119E, D119H, D119I, D119L, D119Q, D119R, D119S, D119T, D119V, D119W, G128C, G128F, G128H, G128K, G128L, G128M, G128N, G128Q, G128R, G128W, G128Y, S129A, S129C, S129D, S129F, S129G, S129H, S129I, S129K, S129L, S129M, S129Q, S129R, S129T, S129V, S129W, S129Y, F130I, F130K, F130L, F130M, F130Q, F130R, F130T, F130V, F130Y, S135P, G136I, G136L, G136P, G136V, G136W, G136Y, S137A, M138I, M138K, M138Q, M138V, D139A, D139C, D139E, D139G, D139H, D139I, D139K, D139L, D139M, D139P, D139R, D139S, D139V, D139W, D139Y, V140C, Q151I, E152A, E152C, E152D, E152F, E152G, E152H, E152L, E152M, E152N, E152R, E152S, E152W, N155D, N155K, N155Q, N155R, D178A, D178C, D178G, D178H, D178K, D178L, D178M, D178N, D178P, D178Q, D178R, D178S, D178T, D178V, D178W, D178Y, T179A, T179F, T179H, T179I, T179K, T179L, T179M, T179N, T179P, T179Q, T179R, T179S, T179T, T179V, T179W, T179Y, E186A, E186C, E186D, E186G, E186H, E186K, E186L, E186M, E186N, E186P, E186Q, E186R, E186S, E186T, E186V, E186W, E186Y, V190H, V190I, V190K, V190L, V190Q, V190R, S191F, S191G, S191H, S191I, S191K, S191L, S191N, S191Q, S191R, S191W, L198M, L198V, S199C, S199D, S199E, S199F, S199I, S199K, S199L, S199N, S199Q, S199R, S199V, Y204H, Y204T, G205F, G205H, G205L, G205M, G205R, G205S, G205Y, K211C, K211D, K211G, K211M, K211N, K211Q, K211R, K211S, K211T, K211V, K214A, K214C, K214E, K214I, K214L, K214M, K214N, K214Q, K214S, K214V, L216A, L216C, L216F, L216H, L216Q, L216R, L216S, L216Y, N218K, N218P, T219D, D220A, D220E, D220H, D220K, D220N, D220P, A221D, A221F, A221I, A221K, A221L, A221M, A221N, A221S, A221V, A221Y, G222C, G222H, G222N, G222P, Y224F, Y224H, Y224N, Y224R, T243C, T243G, T243H, T243I, T243K, T243L, T243Q, T243R, T243W, T243Y, K244A, K244C, K244D, K244E, K244F, K244G, K244L, K244M, K244N, K244Q, K244S, K244T, K244V, K244W, K244Y, V260A, V260D, V260E, V260G, V260H, V260I, V260K, V260L, V260M, V260P, V260Q, V260R, V260S, V260T, V260W, V260Y, Y261C, Y261F, Y261I, Y261L, T263E, T263F, T263H, T263I, T263L, T263M, T263Q, T263V, T263W, T263Y, S265A, S265C, S265D, S265E, S265K, S265N, S265P, S265Q, S265R, S265T, S265V, S265W, K269E, K269F, K269G, K269H, K269I, K269L, K269M, K269N, K269P, K269Q, K269S, K269T, K269V, K269W, K269Y, A273C, A273D, A273H, A273I, A273K, A273L, A273N, A273Q, A273R, A273Y, R280A, R280C, R280D, R280E, R280F, R280G, R280H, R280K, R280L, R280M, R280S, R280T, R280V, R280W, R280Y, L282F, L282G, L282H, L282I, L282K, L282M, L282N, L282Q, L282R, L282V, L282Y, S285A, S285C, S285D, S285E, S285K, S285P, S285Q, S285R, S285W, Q286A, Q286D, Q286E, Q286K, Q286P, Q286R, A289C, A289D, A289E, A289K, A289L, A289R, A293C, A293R, N296C, N296D, N296E, N296K, N296R, N296V, A297C, A297K, A297N, A297Q, A297R y G299N;

donde dicha identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 18 se determina por medio de un BLAST con parámetros predeterminados;

donde dicha variante de metaloproteasa neutra presenta una termoestabilidad mejorada en comparación con la metaloproteasa neutra natural de *B. amyloliquefaciens* que presenta la secuencia de la SEQ ID NO: 18;

rendimiento mejorado en condiciones de pH inferior o superior, en comparación con la metaloproteasa neutra natural de *B. amyloliquefaciens* que presenta la secuencia de la SEQ ID NO: 18; o estabilidad autolítica mejorada, en comparación con la metaloproteasa neutra natural de *B. amyloliquefaciens* que presenta la secuencia de la SEQ ID NO: 18.

[0006] La metaloproteasa neutra aislada variante puede que comprenda múltiples mutaciones seleccionadas entre S023W/G024M, T004V/S023W/G024W, S023W/G024Y/A288V, T004L/S023W/G024Y, N046Q/N050F/T054L, N050Y/T059R/S129Q, S023W/G024W, A273H/S285P/E292G, S023Y/G024Y, S023Y/G024W, T004S/S023Y/G024W, N046Q/T054K, S023W/G024Y, T004V/S023W, T059K/S066N, N046Q/N050W/T054H/T153A, T004V/S023W/G024Y, L282M/Q286P/A289R, N046Q/R047K/N050Y/T054K, L044Q/T263W/S285R, T004L/S023W/G024W, R047K/N050F/T054K, A273H/S285R, N050Y/T059K/S066Q, T054K/Q192K, N046Q/N050W, L282M/Q286K, T059K/S066Q, T004S/S023W, L282M/Q286R/A289R/K011N, L282M/A289R, N046Q/N050W/T054H, T059K/S129Q, T004S/S023N/G024Y/F210L, T004V/S023W/G024M/A289V, L282M/Q286K/A289R/S132T, N050W/T054H, L282M/Q286R, L282F/Q286K/A289R, T059R/S066Q, R047K/N050W/T054H, S265P/L282M/Q286K/A289R, L282M/Q286R/T229S, L282F/Q286K, T263W/S285R, S265P/L282M/Q286K, T263H/A273H/S285R, T059R/S129V, S032T/T263H/A273H/S285R, T059R/S066Q/S129Q, T004S/G024W, T004V/S023W/G024M, T059K/S066Q/S129Q, L282M/Q286K/A289R/I253V, T004V/S023Y/G024W, T059R/S066N/S129Q, N050F/T054L, T004S/S023N/G024W, T059R/S066N, T059R/S066N/S129V, Q286R/A289R, N046Q/R047K/N050F/T054K, S265P/L282M/Q286P/A289R, S265P/L282M/Q286R/A289R Q062K/S066Q/S129I, S023N/G024W, N046Q/R047K/N050W/T054H, R047K/T054K, T004L/G024W, T014M/T059R/S129V, T059R/S066Q/N092S/S129I, R047K/N050W/T054K, T004V/G024W, N047K/N050F/T054K, S265P/L282F/Q286K/E159V, L282F/Q286K/E159V, T004V/S023Y/G024M, S265P/L282F/A289R/T065S, T059K/F063L/S066N/S129V, T004L/S023W, N050F/T054H, T059R/S066Q/S129V, V190I/D220E/S265W/L282F,

- T004S/S023Y/G024M, T004L/S023N/G024Y, T059K/S066N/S129I, T059R/S066N/S129I,
L282M/Q286R/A289R/P162S, N046Q/N050F/T179N, T059K/Y082C/S 129V, T059K/S 129I, N050Y/T054K,
T059K/S066Q/V102A/S129Q, T059R/S066Q/S129I, T059W/S066N/S129V/S290R, T059R/S129I,
T059K/S066Q/S129I, T059K/S066Q/S129V, S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N,
5 T004V/S023N/G024W, S265P/Q286K, S265P/L282F/A289R, D220P/S265W, L055F/T059W/S129V,
T059R/S129Q/S191R, N050W/T054K, T004S/S023W/G024M, R047K/N050F/T054H, T059K/S066N/K088E,
T059K/S066Q/S129I/V291L, L282M/Q286R/A289R, T059R/S066N/F085S/S129I, L282F/Q286P/A289R,
L282F/Q286R/A289R, G099D/S265P/L282F/Q286K/A289R, N046Q/N050F, N050Y/T059W/S066N/S129V,
T009I/D220P/S265N, V190F/D220P/S265W, N157Y/T263W/A273H/S285R, T263W/A273H/S285R,
10 T263W/S285W, T004V/S023Y, N046Q/R047K/N050W, N050W/T054L, N200Y/S265P/L282F/Q286P/A289R,
T059R/S066Q/P264Q, T004V/G024Y, T004L/G024Y, N050Y/S191I, N050Y/T054L,
T004L/S023W/G024Y/N155K, F169I/L282F/Q286R/A289R, L282M/Q286K/A289R,
F130L/M138L/E152W/D183N, N046Q/R047K/N050Y/T054H, T004V/G024M, N050Y/T059W/S066Q/S129V,
S023N/G024Y, T054H/P162Q, T004S/S023W/G024Y, N050Y/T054H, L282F/Q286R/A289R/F169I,
15 R047K/N050W, V190F/D220P, L282M/F173Y, T004L/S023Y, N050W/A288D, V190I/D220P/S265Q,
S265P/L282F/Q286P/A289R, S265P/L282F/Q286R/A289R, N046Q/N050Y/T054K, T059W/S066Q,
T263W/A273H/S285W T263W/A273H/S285P, S023Y/G024M, T004L/S023N/G024W, T004V/S023N/G024Y,
T059W/S066N/S129Q, T004S/S023Y, T004S/S023N/G024M, T059W/S066N/A070T, T059W/S066Q/S129Q,
T263W/A273H, A273H/285P, N046Q/R047K/N050Y/T054L, N046Q/R047K/N050Y, R047K/N050Y,
20 T263H/S285W, R047K/N050F, N046Q/R047K/N050F/T054H, S023N/G024M, T004S/G024Y,
R047K/N050Y/T054H, T059W/S066N/S129I, R047K/T054L, T004S/S023W/G024W, M138L/E152F/T146S,
D220P/S265N, T004S/G024M, T004V/S023N, N046Q/N050F/T054K, N046Q/N050Y/T054H,
Q062H/S066Q/S129Q, T059W/S129Q, T059W/S129V, N050F/T054K, R047K/N050F/T054L,
V190I/D220P/S265W, N112I/T263H/A273H/S285R, T059W/S066N/S129V, T059W/S066Q/S129I, T059W/S129I,
25 T263W/S285P, V190I/D220P, A289V/T263H/A273H, T263H/A273H/S285P, N90S/A273H/S285P,
R047K/N050Y/T054L, T004S/S023N, T059R/S129Q, N046Q/R047K/T054H, T059W/S066Q/S129V,
E152W/T179P, N050Y/S066Q/S129V, T202S/T263W/A273H, T263W/A273H/S285P, M138L/E152W/T179P,
N046Q/R047K, N046Q/T054H/F176L, T004L/G024M, T004S/L282M, T263H/A273H, T263H/A273H/S285W,
T004L/S023Y/G024M, L282F/Q286P, T004V/S023Y/G024Y, V190F/S265W, M138L/E152F,
30 V190F/D220E/S265W, N046Q/N050F/T054H, N157Y/S285W, T004F/S023Y/G024M, T004V/S023N/G024M,
L198I/D220E/S265Q, N046Q/N050Y/T054K/A154T, S016L/D220E/S265W, D220E/S265W,
D220E/A237S/S265W, S066Q/S129Q, V190F/D220E/S265Q/T267I, L282M/F173Y/T219S, E152F/T179P,
V190I/S265W, M138L/S066Q, M138L/E152W, T059W/S066Q/A070T/S129I, V 190F/D220E/S265N,
V190F/S265N, N046Q/N050Y y M138L/E152F/T179P.
- 35 **[0007]** La metaloproteasa neutra aislada variante puede que comprenda múltiples mutaciones seleccionadas
entre V190I/D220P, V190I/D220P/S265Q, V190L/D220E, V190I/D220E/S265Q, V190I/D220E/S265W/L282F,
V190L/D220E/S265Q, V190I/D220E/S265W, V190L/D220E/S265N, T059R/S066Q/S129I, V190I/D220E/S265N,
V190L/D220E/S265W, V190I/D220E, T059W/S066N/S129V, T059K/S066Q/S129V, T059K/Y082C/S129V,
T059R/S066N/S129I, S066Q/S129V, T059R/S066Q/S129V, T059R/S129I, N050Y/T059W/S066N/S129V,
40 D220P/S265N, S066Q/S129I, T059W/S066Q/S129V, T059K/S066Q/S129I, T059R/S129V,
N050Y/S066Q/S129V, T059W/S066Q/S129I, N050Y/T059W/S066Q/S129V, T059K/S129I, D220P/S265W,
F130L/M138L/T179P, S066N/S129I, T059R/S066N/S129V, F130I/M138L/T179P, T059R/S066Q/N092S/S129I,
S066N/S129V, D220E/S265Q, F130L/M138L/E152W/T179P, T059W/S129V, S265P/L282M/Q286R/A289R,
S265P/L282F/Q286R/A289R, T059W/S066N/S129I, V190T/D220P/S265W, F130L/E152W/T179P,
45 F130L/M138L/E152F/T179P, Q062K/S066Q/S129I, T059K/S066N/S129I, E152H/T179P,
S265P/L282M/Q286K/A289R, F130L/M138L/E152H/T179P, T263W/A273H/S285R, D220E/S265N,
F130I/M138L/E152H/T179P, F130V/M138L/E152W/T179P, F130I/M138L/E152W/T179P, T059W/S129I,
D220E/S265W, F130V/M138L/T179P, F130L/E152V/T179P, T059R/S129Q, T263W/S285P,
F130I/M138L/E152F/T179P, E152W/T179P, V190L/S265Q, F130L/E152F/T179P, L282M/Q286R/A289R/P162S,
50 D220P/S265Q, M138L/E152F/T179P, F130I/E152H/T179P, M138L/E152W/T179P, F130L/T179P,
F130L/M138L/E152W/T179P/Q286H, F130L/M138L/E152H, T263W/A273H/S285W, S265P/Q286K,
T059W/S066Q/S129Q, T263W/S285R, T059W/S066N/S129Q, T263W/S285W, T059R/S066N/S129Q,
S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N, T059W/S129Q, Q062H/S066Q/S129Q, L282M/Q286R/A289R,
V190L/D220E/S265NN291I, V 190L/S265N, F 130L/M138L/E152W, N050Y/T059R/S129Q, F130I/T179P,
55 T059K/S066Q/S129Q, T059K/S129Q, S265P/L282M/Q286P/A289R, S265P/L282F/Q286P/A289R,
T263W/A273H/S285P, S265P/L282NVQ286K, S016L/D220E/S265W, S066Q/S129Q, S265P/L282M/Q286P,
L282F/Q286R/A289R, F130V/E152W/T179P, L044Q/T263W/S285R L055F/T059W/S129V, V190L/5265W,
Q286R/A289R, G99D/S265P/L282F/Q286K/A289R, F130L/M138L/E152F, T059R/S066Q/S129Q, F130L/E152H,
S066N/S129Q, T004S/S023N/G024M/K269N, S265P/L282M, E152F/T179P, T059W/S066N/S129V/S290R,
60 L282F/Q286K/A289R, F130L/M138L, F130I/M138L/E152W, S265P/L282F, F130I/M138L/E152H,
F130V/M138L/E152H, V190I/S265Q, M138L/E152M, S265P/L282F/Q286P, M138L/E152H,
T059K/S066N/K088E, V190I/S265W, F130L/E152W, L282M/Q286K/A289R, L282M/Q286K/A289R/I253V,
T263W/A273H, V190I/S265N, M138L/E152W, A273H/S285R, F130I/M138L, F130L/E152F,
F130V/M138L/E152W, T059K/S066Q/V102A/S129Q, F130V/E152H/T179P, F130I/M138L/E152F,

5 F130V/M138L/E152F, M138L/E152F, L282M/Q286R, F130I/E152H, S265P/L282F/A289R/T065S, T263H/A273H/S285R, F130V/M138L, T014M/T059R/S129V, L282M/Q286R/A289R/K11N, A273H/S285P, L282M/Q286K/A289R/S132T, T263H/A273H/S285W, F130V/E152W, S265P/L282F/Q286K/N061Y, F130I/E152W, L198I/D220E/S265Q, V190I/S265L, T263H/S285W, S265P/L282F/A289R, M138L/S066Q, F130I/E152F, N90S/A273H/S285P, S032T/T263H/A273H/S285R, L282F/Q286P/A289R, N157Y/T263W/A273H/S285R, V105A/S129V, T263H/A273H/S285P, S129Q/L282H, T059W/S066Q, F130V/E152H, S023W/G024Y, T004V/S023N, T059R/S066Q, N050W/T054L, L282M/Q286P/A289R, A115V/V190L/S265W, L282M/Q286K, T059R/S066N, L282F/Q286P, T004V/S023W/G024M, S265P/L282F/Q286R/L78H, L282F/Q286K, T004V/S023W/G024Y, S023W/G024M, T059R/R256S, 10 F130V/E152F, T004V/G024W, N050W/T054K, S023Y/G024M, T004V/S023Y, T004V/S023Y/G024M, N050Y/T054H, S023W/G024W, T004V/S023Y/G024Y, T004V/S023N/G024W, F130L/M138L/E152F/T179P/V291I, N050Y/T059K/S066Q, T004V/S023Y/G024W, T059K/S066N, T004V/S023N/G024Y, S023Y/G024W, N050F/T054L, R047K/T054K, S023N/G024W, L282M/A289R, S023Y/G024Y, T004V/G024M, R047K/N050F/T054K, N050F/T054K, T059K/S066Q, S023N/G024M, S023N/G024Y, T004L/S023N, R047K/N050W/T054H, T004L/S023W/G024Y, T004S/S023W, N046Q/N050W/T054H/A142T, T004L/S023Y, T004V/S023W, N050W/T054H, T004S/S023N, T004S/L282M, T004L/S023W, N050F/T054H, N050Y/T054L y R047K/N050W/T054K.

20 **[0008]** La metaloproteasa neutra aislada variante puede que comprenda múltiples mutaciones seleccionadas entre S066Q/S129V, S066Q/S129I, N050Y/S066Q/S129V, S066N/S129I, T059K/S066Q/S129V, S066N/S129V, F130L/E152W/T179P, S265P/L282M/Q286R/A289R, F130L/E152V/T179P, T059K/S066Q/S129I, T263W/S285P, T059K/S066N/S129I, T263W/A273H/S285P, S265P/L282F/Q286R/A289R, F130V/E152W/T179P, T263W/A273H/S285R, V190I/D220P/S265W, F130L/E152H, S066N/S129Q, S265P/L282M/Q286K/A289R, V 190I/D220E, T059R/S066N/S129I, V190I/D220E/S265W, T059K/S129I, T059R/S066Q/S129I, 25 F130I/M138L/E152H/T179P, F130I/T179P, T263W/A273H/S285W, S016L/D220E/S265W, S066Q/S129Q, V190I/D220E/S265Q, T059R/S066Q/S129V, D220E/S265N, V190L/D220E, D220E/S265W, V190I/D220P, V190L/D220E/S265N, L044Q/T263W/S285R, S265P/L282M/Q286P/A289R, F130L/M138L/E152H/T179P, T263W/S285R, L282M/Q286R/A289R, T263W/S285W, F130I/E152H/T179P, V190I/D220E/S265N, V190L/D220E/S265W, V190I/D220P/S265Q, T059R/S066N/S129V, V190L/D220E/S265Q, E152H/T179P, 30 F130L/M138L/E152F/T179P, Q062H/S066Q/S129Q, T059R/S129V, V190I/D220E/S265W/L282F, V190I/S265Q, F130L/E152F/T179P, D220E/S265Q, E152W/T179P, T059K/S066Q/S129Q, F130L/M138L/T179P, F130I/M138L/E152F/T179P, F130L/M138L/E152W/T179P, N050Y/T059W/S066Q/S129V, S265P/L282M/Q286K, T059R/S129I, F130V/E152H/T179P, D220P/S265N, S265P/L282M/Q286P, F130I/E152H, T059R/S066Q/N092S/S129I, F130L/T179P, G99D/S265P/L282F/Q286K/A289R, T263W/A273H, V190I/S265N, 35 D220P/S265W, F130L/E152W, F130L/M138L/E152H, S265P/L282M, V190I/S265Q, F130L/E152F, T059K/S129Q, Q286R/A289R, M138L/E152W/T179P, F130I/M138L/E152H, D220P/S265Q, V190L/S265N, F130I/M138L/E152W, S265P/Q286K, V190L/S265Q, V190I/S265W, F130L/M138L/E152F, F130V/E152H, E152F/T179P, N050Y/T059W/S066N/S129V, T059R/S066N/S129Q, F130I/E152W, F130V/E152W, T059R/S066Q/S129Q, T263H/A273H/S285P, N90S/A273H/S285P, V190L/D220E/S265N/V291I, T059R/S129Q, 40 A273H/S285P, F130I/M138L/E152W/T179P, F130V/M138L/E152F, N050Y/T059R/S129Q, T059W/S066Q/S129I, F130V/M138L/T179P, F130V/M138L/E152W/T179P, V190L/S265W, F130V/M138L/E152W, T059W/S066Q/S129V, V190I/S265Q, F130V/M138L/E152H, F130I/E152F, N157Y/T263W/A273H/S285R, T263H/S285W, M138L/E152F/T179P, A115V/V190L/S265W, M138L/E152M, T263H/A273H/S285W, F130L/M138L/E152W, T059K/S066N/K088E, F130I/M138L/E152F, F130I/M138L/T179P, T004V/S023N, 45 T059K/S066Q/N102A/S129Q, F130L/M138L, N047K/N050F/T054K, T263H/A273H/S285R, F130L/M138L/E152W/T179P/Q286H, M138L/E152H, M138L/S066Q, L282M/Q286R/A289R/P162S, L282F/Q286R/A289R, Q062K/S066Q/S129I, A273H/S285R, S265P/L282F/Q286P, S265P/L282F/Q286P/A289R, S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N, T059W/S066N/S129I, V190I/S265L, T059W/S066N/S129V, F130I/M138L, L282M/Q286K/A289R/I253V, R047K/N050F/T054K, M138L/E152F, N050W/T054K, 50 L198I/D220E/S265Q, L282F/Q286K/A289R, N050F/T054K, L282M/Q286R, M138L/E152W, S265P/L282F, F130V/E152F, T059W/S066N/S129Q, F130V/M138L, T263H/A273H, L282M/Q286K/A289R, N046Q/N050W/T054H/A142T, T059W/S066Q/S129Q, S265P/L282F/A289R/T065S, N050F/T054H, S129Q/L282H, L282M/Q286K/A289R/S132T, L282M/Q286R/A289R/K11N, T059K/S066N, R047K/N050W/T054K, T059K/S066Q, T004V/S023Y, T059W/S066N/S129V/S290R, N050Y/T059K/S066Q y 55 R047K/N050Y.

60 **[0009]** La invención proporciona además un polinucleótido que codifica la metaloproteasa neutra de la invención, un vector de expresión que comprende un polinucleótido de dichas características y una célula hospedadora que comprende un vector de expresión de dichas características.

[0010] También se proporciona un método para producir una enzima que presenta actividad de metaloproteasa neutra, que comprende el cultivo de la célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas para la producción de dicha variante de metaloproteasa neutra.

[0011] El método puede que comprenda además la etapa de recolectar dicha variante de metaloproteasa neutra producida.

[0012] La célula hospedadora puede que sea una especie *Bacillus*.

[0013] La invención proporciona asimismo composiciones que comprenden la variante de metaloproteasa neutra de la invención, que incluyen composiciones limpiadoras, composiciones de pienso, composiciones de elaboración de tejidos y composiciones de tratamiento del cuero.

[0014] La presente invención proporciona composiciones limpiadoras que comprenden (por ejemplo) al menos un 0.0001 por ciento en peso de la metaloproteasa neutra de la presente invención y, de manera opcional, un ingrediente auxiliar. En algunas formas de realización, la composición comprende un ingrediente auxiliar. En algunas formas de realización preferentes, la composición comprende una cantidad suficiente de un modificador del pH para dotar a la composición de un pH puro de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, estando la composición fundamentalmente libre de materiales que hidrolizan a un pH de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5. En algunas formas de realización preferentes en concreto, los materiales que hidrolizan comprenden un material tensioactivo. En formas de realización adicionales, la composición limpiadora es una composición líquida, mientras que en otras formas de realización la composición limpiadora es una composición sólida y, en otras formas de realización más, la composición limpiadora es un gel. De hecho, no se pretende que la presente invención esté limitada a una formulación y/o composición en concreto, puesto que se utilizan diversas formulaciones y/o composiciones en la presente invención. En otras formas de realización, el material tensioactivo comprende un tensioactivo de alquilsulfato de sodio que comprende una fracción de óxido de etileno.

[0015] La presente invención proporciona de manera adicional composiciones limpiadoras que, además de al menos una metaloproteasa neutra de la presente invención, comprenden también al menos una enzima estable en ácido, comprendiendo la composición limpiadora una cantidad suficiente de un modificador del pH para dotar a la composición de un pH puro de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, estando la composición fundamentalmente libre de materiales que hidrolizan a un pH de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5. En otras formas de realización, los materiales que hidrolizan comprenden un material tensioactivo. En algunas formas de realización preferentes, la composición limpiadora es una composición líquida. En otras formas de realización adicionales, el material tensioactivo comprende un tensioactivo de alquilsulfato de sodio que comprende una fracción de óxido de etileno. En algunas formas de realización, la composición limpiadora comprende un ingrediente auxiliar adecuado. En algunas formas de realización adicionales, la composición comprende un ingrediente auxiliar adecuado. En algunas formas de realización preferentes, la composición comprende entre aproximadamente 0.001 y aproximadamente 0.5 % en peso de metaloproteasa neutra.

[0016] En algunas formas de realización preferentes alternativas, la composición comprende entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 0.1 por ciento en peso de metaloproteasa neutra.

[0017] La presente invención proporciona también métodos de limpieza, comprendiendo las etapas de:

- a) poner en contacto una superficie y/o un artículo que comprende una tela con una concentración apropiada de la composición limpiadora que comprende la metaloproteasa neutra de la presente invención; y b) opcionalmente, lavar y/o aclarar la superficie o material. En las formas de realización alternativas, toda composición adecuada que se proporcione en la presente memoria se utiliza en dichos métodos. En algunas formas de realización, la tela comprende al menos una mancha de hierba. En algunas formas de realización preferentes en concreto, las composiciones limpiadoras de la presente invención se utilizan para eliminar la hierba y otras manchas de las telas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0018]

La Figura 1 proporciona un gráfico que muestra los resultados de la determinación de las constantes de afinidad de una proteína de unión a MULTIFECT® Neutral purificada para cationes de cinc y calcio por medio de los tintes fluorescentes Fluo-Zn3 y Fluo-3, respectivamente.

La Figura 2 proporciona un gráfico que muestra la inhibición de actividad de proteasa de 0.36 mg/ml de nprE de *B. amyloliquefaciens* recombinante formulada mediante sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) analizada mediante el ensayo de proteasas QuantiCleave™.

La Figura 3 proporciona un alineamiento de secuencias de diversos homólogos de metaloproteasa (SEQ ID NOS:173-181) que se utilizan en la presente invención.

La Figura 4 proporciona un alineamiento de secuencias de diversos homólogos de metaloproteasa (SEQ ID NOS:182-191) que se utilizan en la presente invención. En esta Figura, la numeración corresponde a la termolisina (*B. thermoproteolyticus*). Al igual que en la Figura 3, el «*» indica residuos conservados, «:» indica residuos reemplazados de manera conservadora y «.» indica residuos similares.

5 La Figura 5 proporciona un alineamiento de secuencias de diversos homólogos de metaloproteasa (SEQ ID NOS:192-195) identificados a través de modelado por homología.

La Figura 6 proporciona un mapa del plásmido pJ4:GO1905.

La Figura 7 proporciona un mapa del plásmido pJ4: G01906.

La Figura 8 proporciona un mapa del plásmido pJ4:G01907.

10 La Figura 9 proporciona un mapa del plásmido pJ4:G01908.

La Figura 10 proporciona un mapa del plásmido pJ4:G01909.

La Figura 11 proporciona un mapa del plásmido pJ4:G01938.

La Figura 12 proporciona un mapa del plásmido pJHT.

La Figura 13 proporciona un mapa del plásmido pAC.

15 La Figura 14 proporciona un mapa de pUBnprE.

La Figura 15 proporciona un esquema que muestra la amplificación del promotor de aprE y de los fragmentos de gen de nprE de *B. subtilis*.

La Figura 16 proporciona un mapa del plásmido pEL501.

20 La Figura 17 proporciona un esquema que muestra la amplificación del promotor de aprE y de los fragmentos de gen de nprB de *B. subtilis*.

La Figura 18 proporciona un mapa del plásmido pEL508.

La Figura 19 proporciona un esquema que muestra la amplificación del promotor de aprE y de los fragmentos de gen de nprT de *B. stearothermophilus*, utilizados en la producción de la cepa EL560.

La Figura 20 proporciona un diagrama que muestra la construcción de la cepa EL560.

25 La Figura 21 proporciona un esquema que muestra la amplificación del promotor de aprE y de los fragmentos de gen de npr de *B. caldolyticus*, utilizados en la producción de la cepa EL561.

La Figura 22 proporciona un diagrama que muestra la construcción de la cepa EL561.

La Figura 23 proporciona un esquema que muestra la amplificación del promotor de aprE y de los fragmentos de gen de nprB de *B. thuringiensis*.

30 La Figura 24 proporciona un mapa del plásmido pEL568.

La Figura 25 proporciona un gráfico que muestra los resultados de experimentos pensados para determinar el almacenamiento a largo plazo de 0,36 mg/ml de concentrado ultrafiltrado de metaloproteasa neutra (nprE) en una base de TIDE® 2005 en presencia de iones de cinc y calcio a 32 °C. A efectos comparativos, se proporcionan los resultados obtenidos de prueba sin sal y con un exceso de calcio.

35 La Figura 26 proporciona datos de una prueba de rendimiento de lavado por medio de un Terg-O-Tometer (TOM) y sustratos de distinta suciedad. El gráfico A proporciona resultados que muestran la eliminación de suciedad delta (en %) de la subtilisina (BPN' Y217L) y MULTIFECT® Neutral purificada en EMPA 116 (fijada y sin fijar sobre algodón) tras un lavado a 15 °C en detergente líquido TIDE®-2005. El gráfico B proporciona resultados que muestran la eliminación de suciedad delta (en %) de la subtilisina (BPN' Y217L) y MULTIFECT® Neutral purificada en una mancha de hierba de suciedad media Equest® sobre algodón tras un lavado a 15 °C en detergente líquido TIDE®-2005. El gráfico C proporciona resultados que muestran la eliminación de suciedad delta (en %) de la subtilisina (BPN' Y217L) y MULTIFECT® Neutral purificada en CFT C-10 (pigmento, aceite, leche sobre algodón) tras un lavado a 15 °C en detergente líquido TIDE®-2005.

La Figura 27 proporciona un gráfico que muestra los resultados de barridos de DSC para 440 ppm de NprE y variantes obtenidas por medio de la DSC VP-Cap (MicroCal™).

La Figura 28 proporciona un gráfico que muestra los resultados de barridos de DSC para 440 ppm de NprE y variantes en presencia de 130 mM de citrato obtenidos por medio de la DSC VP-Cap (MicroCal™).

5 La Figura 29 proporciona un gráfico que muestra los puntos de fusión térmica para 440 ppm de NprE en presencia de diversos aditivos y obtenidos por medio de la DSC VP-Cap (MicroCal™). En esta Figura, la línea horizontal representa el T_m para la NprE natural sin aditivos.

La Figura 30 proporciona un gráfico que muestra la actividad restante de nprE y homólogos de nprE en 25 % de TIDE@ a 25 °C tras 90 minutos.

10 La Figura 31 proporciona un gráfico que muestra el rendimiento de lavado de BMI de nprE y homólogos de nprE.

La Figura 32 proporciona un gráfico que muestra los resultados de medidas de estabilidad de NprE en diversas mezclas de formulaciones.

15 La Figura 33 proporciona gráficos (Gráficos A, B y C) que muestran la tasa de inactivación de NprE con distintas concentraciones en % de DTPA con una concentración fija de formiato cálcico.

La Figura 34 proporciona gráficos (Gráficos A, B y C) que muestran los perfiles de predicción generados por un *software* de análisis de DOE de una composición de DTPA y formiato cálcico en función del objetivo de respuesta (tasa de decrecimiento).

20 La Figura 35 proporciona las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS:222-226) para los fragmentos autolíticos de NprE inducidos por citrato y destaca los sitios de autólisis. Los Fragmentos 1 y 2 son el primer corte, mientras que los Fragmentos 3-5 representan el segundo corte. Las letras en cursiva representan los extremos N-terminales secuenciados y las letras en negrita destacan los péptidos que se identificaron a partir de la digestión en gel de los respectivos fragmentos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 [0019] La presente invención proporciona métodos y composiciones que comprenden al menos una enzima de metaloproteasa neutra que presenta una estabilidad en el almacenamiento mejorada. En algunas formas de realización, la metaloproteasa neutra se utiliza en aplicaciones de limpieza y en otras aplicaciones. En algunas formas de realización preferentes en concreto, la presente invención proporciona métodos y composiciones que comprenden metaloproteasa(s) neutra(s) obtenidas a partir de *Bacillus sp.* En algunas formas de realización más preferentes en concreto, la metaloproteasa neutra se obtiene a partir de *B. amyloliquefaciens*. En formas de realización todavía más preferentes, la metaloproteasa neutra es una variante de la metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens*. En otras formas de realización adicionales, la metaloproteasa neutra es homóloga de la metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens*. La presente invención se utiliza en concreto en aplicaciones que incluyen, sin carácter limitativo, limpieza, blanqueo y desinfección.

40 [0020] Salvo que se indique de otro modo, la puesta en práctica de la presente invención implica técnicas convencionales comúnmente utilizadas en biología molecular, microbiología, purificación de proteínas, ingeniería de proteínas, secuenciación de proteínas y de ADN, y campos del ADN recombinante, que se encuentran dentro de la pericia del experto en la materia. Dichas técnicas son conocidas por los expertos en la materia y están descritas en multitud de textos y obras de referencia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Cold Spring Harbor), [1989]); y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* [1987]).

45 [0021] Asimismo, los encabezados proporcionados en la presente memoria no constituyen limitaciones a los diversos aspectos o formas de realización de la invención, que pueden tomarse por referencia a la memoria en su conjunto. En consecuencia, los términos que se definen justo a continuación se encuentran definidos de manera más completa en referencia a la memoria en su conjunto. No obstante, con el objetivo de facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen una serie de términos.

Definiciones

55 [0022] Salvo que se defina de otro modo en el presente texto, todos los términos técnicos y científicos tienen en el presente texto el mismo significado que el que entienden comúnmente los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. Por ejemplo, Singleton y Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*,

2ª Ed., John Wiley and Sons, NY (1994); y Hale y Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology*, Harper Perennial, NY (1991) dotan a los expertos en la materia de diccionarios generales de muchos de los términos utilizados en el presente documento. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente texto se utilizan en la práctica de la presente invención, los métodos y materiales preferentes están descritos en la presente memoria. En consecuencia, los términos que se definen justo a continuación se encuentran definidos de manera más completa en referencia a la Memoria en su conjunto. Asimismo, en el sentido en que se usan en la presente memoria, los términos singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen la referencia al plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Salvo que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en una orientación de amino a carboxi, respectivamente. Se entiende que esta invención no se encuentra limitada a la metodología, protocolos y reactivos descritos en concreto, puesto que estos pueden variar, en función del contexto en que sean utilizados por los expertos en la materia.

[0023] Se pretende que todo límite numérico máximo dado a lo largo de esta memoria incluya todo límite numérico inferior, como si dichos límites numéricos inferiores estuvieran escritos expresamente en el presente texto. Todo límite numérico mínimo dado a lo largo de esta memoria incluirá todo límite numérico superior, como si dichos límites numéricos superiores estuvieran escritos expresamente en el presente texto. Todo intervalo numérico dado a lo largo de esta memoria incluirá todo intervalo numérico más reducido que se encuentre dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si dichos intervalos numéricos más reducidos estuvieran escritos expresamente en el presente texto.

[0024] El hecho de citar un documento no ha de interpretarse como el reconocimiento de que se trata de la técnica anterior con respecto a la presente invención.

[0025] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «blanqueo» designa el tratamiento de un material (por ejemplo, tela, ropa, pulpa, etc.) o superficie durante un periodo suficiente de tiempo y en unas condiciones de pH y temperatura apropiadas para producir un abrillantamiento (es decir, un blanqueamiento) y/o una limpieza del material. Los ejemplos de sustancias químicas adecuadas para el blanqueo incluyen, sin carácter limitativo, ClO_2 , H_2O_2 , perácidos, NO_2 , etc.

[0026] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «desinfección» designa la eliminación de contaminantes de las superficies, así como la inhibición o destrucción de microbios sobre las superficies de los artículos. No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna superficie ni artículo en concreto ni a contaminante(s) o microbios que van a eliminarse.

[0027] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «multímero» designa dos o más proteínas o péptidos que están asociados por unión covalente o no covalente y que existen en forma de complejo en solución. Un «dímero» es un multímero que contiene dos proteínas o péptidos; un «trímero» contiene tres proteínas o péptidos, etc. En el sentido en que se usa en la presente memoria, «octámero» designa un multímero de ocho proteínas o péptidos.

[0028] En el sentido en que se usa en la presente memoria, se entiende por «productos para el cuidado personal» productos utilizados en la limpieza, blanqueo y/o desinfección del cabello, piel, cuero cabelludo y dientes, lo que incluye, sin carácter limitativo, champús, lociones corporales, geles de ducha, hidratantes tópicos, pasta de dientes y/u otros limpiadores tópicos. En algunas formas de realización preferentes en concreto, estos productos se aplican en humanos, mientras en otras formas de realización, estos productos se utilizan en animales no humanos (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias).

[0029] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «composiciones limpiadoras» y «formulaciones limpiadoras», salvo que se indique de otro modo, designan composiciones que se utilizan en la eliminación de compuestos indeseados de artículos que van a ser limpiados, como tela, vajillas, lentes de contacto, otros sustratos sólidos, cabello (champús), piel (jabones y cremas), dientes (colutorios, pastas de dientes), etc. El término abarca cualquier material/compuesto seleccionado para el tipo concreto de composición limpiadora deseada y para la forma del producto (por ejemplo, composición líquida, en gel, granulada o en pulverizador), siempre que la composición sea compatible con la metaloproteasa neutra y el resto de enzimas utilizadas en la composición. La selección específica de los materiales de la composición limpiadora se realiza con facilidad al tener en cuenta la superficie, el artículo o la tela que va a ser limpiado, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza en el uso.

[0030] Los términos designan además cualquier composición que sea adecuada para la limpieza, blanqueo, desinfección y/o esterilización de cualquier objeto y/o superficie. Se pretende que los términos incluyan, sin carácter limitativo, composiciones detergentes (por ejemplo, detergentes para ropa y detergentes para telas delicadas líquidos y/o sólidos; formulaciones limpiadoras de superficies duras, como encimeras y ventanas de

vidrio, madera, cerámica y metal; limpiadores de alfombras; limpiahornos; ambientadores para la ropa; suavizantes de telas; y pretratadores textiles y para la ropa, así como lavavajillas).

[0031] De hecho, el término «composición limpiadora» en el sentido en que se usa en la presente memoria incluye, salvo que se indique de otro modo, agentes de lavado en forma granulada o en polvo multiusos o de alto rendimiento, sobre todo detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en forma líquida, en gel o pasta, sobre todo los tipos denominados líquidos de alto rendimiento (HDL); detergentes líquidos para telas delicadas; agentes de lavavajillas a mano o agentes de lavavajillas de bajo rendimiento, sobre todo los del tipo muy espumoso; agentes de lavavajillas a máquina, que incluyen los diversos tipos en pastillas, granulados, líquidos y agentes de aclarado para uso doméstico e institucional; agentes de limpieza y desinfección líquidos, lo que incluye los tipos de jabón de manos antibacterianos, pastillas de jabón, colutorios, productos de limpieza de dentaduras postizas, limpiadores jabonosos para automóviles o alfombras, productos de limpieza para el baño, champús para el cabello y productos para el aclarado capilar; geles de ducha y geles de baño y limpiadores de metales, así como auxiliares de limpieza como aditivos de blanqueo y los tipos «quitamanchas en barra» o de pretratamiento.

[0032] En el sentido en que se usa en la presente memoria, los términos «composición detergente» y «formulación de detergente» se utilizan en referencia a mezclas que están pensadas para ser usadas en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios. En algunas formas de realización preferentes, el término se utiliza en referencia al lavado de telas y/o prendas (por ejemplo, «detergentes para ropa»). En formas de realización alternativas, el término designa otros detergentes, como los utilizados para limpiar vajilla, cubertería, etc. (por ejemplo, «detergentes lavavajillas»). No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna formulación o composición detergente en concreto. De hecho, se pretende que, además de metaloproteasa neutra, el término abarque detergentes que contienen tensioactivos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, óxidorreductasas, adyuvantes, agentes de blanqueo, activadores del blanqueo, agentes de azulado y tintes fluorescentes, inhibidores de la aglomeración, agentes secuestrantes, activadores enzimáticos, antioxidantes y solubilizantes.

[0033] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «Enzima del solicitante» designa las metaloproteasas neutras de la presente invención.

[0034] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «rendimiento potenciado» en un detergente se define como el aumento de la limpieza de manchas sensibles al blanqueo (por ejemplo, de hierba, té, vino, sangre, suciedad, etc.), tal y como se determina por medio de una evaluación habitual tras un ciclo de lavado estándar. En formas de realización concretas, la metaloproteasa neutra de la presente invención proporciona un rendimiento potenciado en la eliminación de manchas y suciedad de color. En otras formas de realización, la enzima de la presente invención proporciona un rendimiento potenciado a la hora de eliminar y/o decolorar manchas.

[0035] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «composición limpiadora de superficies duras» designa composiciones detergentes para limpiar superficies duras como suelos, paredes, azulejos, mobiliario de baño y la cocina, y similares. Dichas composiciones se proporcionan en cualquier forma, lo que incluye, sin carácter limitativo, sólidos, líquidos, emulsiones, etc.

[0036] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «composición de lavavajillas» designa todas las formas de las composiciones para lavar vajilla, lo que incluye, sin carácter limitativo, formas granuladas y líquidas.

[0037] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «composición limpiadora de telas» designa todas las formas de composiciones detergentes para limpiar telas, lo que incluye, sin carácter limitativo, formas granuladas, líquidas y en pastilla.

[0038] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «producto textil» designa telas tejidas, así como fibras y filamentos cortados adecuados para su conversión o uso como hilos, tejidos, géneros de punto y telas no tejidas. El término abarca hilos hechos de fibras naturales, así como sintéticas (por ejemplo, fabricadas).

[0039] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «materiales textiles» es un término general para fibras, intermedios de hilo, hilos, telas y productos elaborados de tela (por ejemplo, prendas y otros artículos).

[0040] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «tela» abarca cualquier material textil. Por consiguiente, se pretende que el término abarque prendas así como telas, hilos, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos y cualquier otro material textil.

[0041] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «compatible» significa que los materiales de la composición limpiadora no reducen la actividad enzimática de la metaloproteasa neutra hasta tal punto que la metaloproteasa neutra no tiene la eficacia deseada en situaciones de uso normales. Más adelante se ejemplificarán con detalle los materiales de composición limpiadora específicos.

[0042] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «cantidad eficaz de enzima» designa la cantidad de enzima necesaria para lograr la actividad enzimática requerida en la aplicación específica (por ejemplo, producto para el cuidado personal, composición limpiadora, etc.). Dichas cantidades eficaces se determinan con facilidad por un experto en la materia y dependen de muchos factores, como la variante de enzima concreta utilizada, la aplicación de limpieza, la composición específica de la composición limpiadora, y si se necesita una composición líquida o seca (por ejemplo, granulada, en pastilla), y similares.

[0043] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «composiciones limpiadoras no de telas» abarca composiciones limpiadoras de superficies duras, composiciones de lavavajillas, composiciones limpiadoras de cuidado personal (por ejemplo, composiciones limpiadoras orales, composiciones limpiadoras de dentaduras postizas, composiciones de aseo personal, etc.) y composiciones adecuadas para su uso en la industria de la pulpa y el papel.

[0044] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «composiciones limpiadoras orales» designa dentífricos, pastas de dientes, geles dentífricos, polvos dentífricos, colutorios, *sprays* bucales, geles bucales, chicles, pastillas para chupar, sobres, comprimidos, biogeles, pastas de profilaxis, soluciones de tratamiento odontológico y similares.

[0045] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «transferasa» designa una enzima que cataliza la transferencia de compuestos funcionales a una serie de sustratos.

[0046] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «grupo saliente» designa el nucleófilo que se corta del dador de acilo tras la sustitución por otro nucleófilo.

[0047] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «conversión enzimática» designa la modificación de un sustrato a un producto intermedio o la modificación de un producto intermedio a un producto final por medio de la puesta en contacto del sustrato o producto intermedio con una enzima. En algunas formas de realización, la puesta en contacto se realiza por medio de la exposición directa del sustrato o producto intermedio a la enzima apropiada. En otras formas de realización, la puesta en contacto comprende la exposición del sustrato o producto intermedio a un organismo que expresa y/o excreta la enzima, y/o metaboliza el sustrato y/o producto intermedio deseado hasta obtener el producto intermedio y/o producto final deseado, respectivamente.

[0048] En el sentido en que se usa en la presente memoria, la frase «estabilidad del detergente» designa la estabilidad de una composición detergente. En algunas formas de realización, la estabilidad se valora en el uso del detergente, mientras que en otras formas de realización el término designa la estabilidad de una composición detergente en el almacenamiento.

[0049] En el sentido en que se usa en la presente memoria, la frase «estabilidad frente a la proteólisis» designa la capacidad de una proteína (por ejemplo, una enzima) de resistir a la proteólisis. No se pretende que el término esté limitado al uso de una proteasa en concreto para valorar la estabilidad de una proteína.

[0050] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «estabilidad frente a la oxidación» designa la capacidad de una proteína de funcionar en condiciones oxidantes. En concreto, el término designa la capacidad de una proteína de funcionar en presencia de diversas concentraciones de H_2O_2 y/o perácido. La estabilidad en diversas condiciones oxidantes puede medirse por medio de procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia y/o por medio de los métodos descritos en el presente documento. Se manifiesta un cambio sustancial en la estabilidad frente a la oxidación por un aumento o reducción de al menos un 5 % aproximadamente o más (en la mayoría de formas de realización, un aumento es preferible) de la vida media de la actividad enzimática, en comparación con la actividad enzimática presente en ausencia de compuestos oxidantes.

[0051] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «estabilidad al pH» designa la capacidad de una proteína de funcionar a un pH concreto. En general, la mayoría de las enzimas presentan un intervalo de pH finito en el cual funcionarán. Además de las enzimas que funcionan en pH de intervalo medio (es decir, alrededor del pH 7), existen enzimas capaces de funcionar en condiciones con un pH muy alto o muy bajo. La estabilidad en diversos pH puede medirse o por medio de procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia y/o por medio de los métodos descritos en el presente documento. Se manifiesta un cambio sustancial en la estabilidad al pH por un aumento o reducción de al menos un 5 % aproximadamente o más (en la mayoría de formas de realización, un aumento es preferible) de la vida media de la actividad enzimática en comparación con

la actividad enzimática al pH óptimo de la enzima. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún nivel de estabilidad al pH ni intervalo de pH.

[0052] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «estabilidad térmica» designa la capacidad de una proteína de funcionar a una temperatura concreta. En general, la mayoría de las enzimas presentan un intervalo de temperaturas finito a las cuales funcionarán. Además de las enzimas que funcionan a temperaturas en el intervalo medio (por ejemplo, temperatura ambiente), existen enzimas capaces de funcionar a temperaturas muy altas o muy bajas. La estabilidad térmica puede medirse por medio de procedimientos conocidos o por medio de los métodos descritos en el presente documento. Se manifiesta un cambio sustancial en la estabilidad térmica por un aumento o reducción de al menos un 5 % aproximadamente o más (en la mayoría de formas de realización, un aumento es preferible) de la vida media de la actividad catalítica de un mutante cuando se expone a una temperatura distinta (es decir, mayor o menor) que la temperatura óptima para la actividad enzimática. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún nivel de estabilidad a la temperatura ni intervalo de temperatura.

[0053] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «estabilidad química» designa la estabilidad de una proteína (por ejemplo, una enzima) frente a sustancias químicas que tienen un efecto adverso en su actividad. En algunas formas de realización, dichas sustancias químicas incluyen, sin carácter limitativo, peróxido de hidrógeno, perácidos, detergentes aniónicos, detergentes catiónicos, detergentes no iónicos, quelantes, etc. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún nivel de estabilidad química ni intervalo de estabilidad química en concreto.

[0054] En el sentido en que se usa en la presente memoria, la frase «mejora de la actividad de la metaloproteasa neutra» designa la mejora relativa de la actividad de la metaloproteasa neutra en comparación con una enzima estándar. En algunas formas de realización, el término designa una tasa mejorada de formación del producto, mientras que en otras formas de realización el término abarca composiciones que producen menos producto de hidrólisis. En formas de realización adicionales, el término designa composiciones de metaloproteasa neutra con una especificidad de sustrato alterada.

[0055] En el sentido en que se usa en la presente memoria, la frase «alteración de la especificidad de sustrato» designa cambios de la especificidad de sustrato de una enzima. En algunas formas de realización, se define un cambio de la especificidad de sustrato como una diferencia entre la relación K_{cat}/K_m observada con una enzima en comparación con variantes de la enzima u otras composiciones enzimáticas. Las especificidades de sustrato enzimático varían en función del sustrato que se somete a prueba. La especificidad de sustrato de una enzima se determina por medio de la comparación de las eficacias catalíticas que esta muestra con distintos sustratos. Estas determinaciones se utilizan en concreto a la hora de valorar la eficacia de las enzimas mutantes, puesto que por lo general se desea producir variantes de enzimas que presenten unas relaciones mayores para unos sustratos de interés en concreto. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna composición de sustrato concreta ni especificidad de sustrato específica.

[0056] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «propiedad de superficie» se usa en referencia a una carga electrostática, así como a propiedades como la hidrofobicidad y/o hidrofilia que presenta la superficie de una proteína.

[0057] En el sentido en que se usa en la presente memoria, la frase «se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en...» significa que las fracciones o elementos que se seleccionan a partir del grupo de *Markush* referido pueden ser iguales, pueden ser diferentes o cualquier mezcla de elementos según se indica en el siguiente ejemplo:

[0058] Una molécula que presenta 3 grupos R, donde cada grupo R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en A, B y C. Aquí, los tres grupos R puede que sean: AAA, BBB, CCC, AAB, AAC, BBA, BBC, CCA, CCB o ABC.

[0059] En referencia a composiciones químicas, el término «sustituido» en el sentido en que se usa en la presente memoria significa que la composición o radical orgánico al que se aplica el término:

- (a) se hace insaturado por medio de la eliminación de al menos un elemento o radical; o
- (b) se reemplaza al menos un hidrógeno del compuesto o radical por una fracción que contiene uno o más de un átomo de (i) carbono, (ii), oxígeno, (iii) azufre, (iv) nitrógeno o (v) halógeno; o
- (c) (a) y (b).

[0060] Las fracciones que puede que reemplacen al hidrógeno como se describe en el apartado (b) inmediatamente anterior, que únicamente contienen átomos de carbono e hidrógeno, son fracciones de hidrocarburo que incluyen, sin carácter limitativo, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alquildienilo, cicloalquilo,

fenilo, alquilfenilo, naftilo, antrilo, fenantrilo, fluorilo y esteroide, y combinaciones de estos grupos entre sí y con grupos hidrocarburos polivalentes tales como grupos alquileo, alquilideno y alquilidino. Las fracciones que contienen átomos de oxígeno que puede que reemplacen al hidrógeno como se describe en el apartado (b) inmediatamente anterior incluyen, sin carácter limitativo, grupos que contienen hidroxilo, acilo o ceto, éter, epóxido, carboxilo y éster. Las fracciones que contienen átomos de azufre que puede que reemplacen al hidrógeno como se describe en el apartado (b) inmediatamente anterior incluyen, sin carácter limitativo, los grupos ácido y éster de ácido que contienen azufre, grupos tioéter, grupos mercapto y grupos tioceto. Las fracciones que contienen átomos de nitrógeno que puede que reemplacen al hidrógeno como se describe en el apartado (b) inmediatamente anterior incluyen, sin carácter limitativo, grupos amino, el grupo nitro, grupos azoicos, grupos amonio, grupos amida, grupos azido, grupos isocianato, grupos ciano y grupos nitrilo. Las fracciones que contienen átomos de halógeno que puede que reemplacen al hidrógeno como se describen en el apartado (b) inmediatamente anterior incluyen grupos cloro, bromo, fluoro, yodo, y cualquiera de las fracciones descritas anteriormente en que un hidrógeno o un grupo alquilo pendiente se sustituye por un grupo halo para formar una fracción sustituida estable.

[0061] Se entiende que cualquiera de las fracciones (b)(i) a (b)(v) anteriores pueden sustituirse entre sí en una sustitución monovalente o mediante la pérdida de hidrógeno en una sustitución polivalente para formar otra fracción monovalente que puede reemplazar al hidrógeno en el compuesto o radical orgánico.

[0062] En el sentido en que se usa en la presente memoria, los términos «purificado» y «aislado» designan la eliminación de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, las metaloproteasas neutras se purifican por medio de la eliminación de proteínas contaminantes y otros compuestos en una solución o preparación que no son metaloproteasas neutras. En algunas formas de realización, las metaloproteasas neutras recombinantes se expresan en células hospedadoras bacterianas o fúngicas, y estas metaloproteasas neutras recombinantes se purifican por medio de la eliminación de los demás constituyentes de la célula hospedadora; el porcentaje de polipéptidos de metaloproteasa neutra recombinante aumenta de este modo en la muestra. En formas de realización particularmente preferentes, la metaloproteasa de la presente invención se purifica sustancialmente hasta un nivel de al menos un 99 % aproximadamente del componente proteico, tal y como determina SDS-PAGE u otros métodos estándar conocidos en la técnica. En formas de realización preferentes alternativas, la metaloproteasa de la presente invención comprende al menos un 99 % aproximadamente del componente de proteasa de las composiciones. En otras formas de realización alternativas, la metaloproteasa está presente en un intervalo de aproximadamente al menos un 90-95 % de la proteína y/o proteasa total.

[0063] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «proteína de interés» designa una proteína (por ejemplo, una enzima o «enzima de interés») que se está analizando, identificando y/o modificando. Las proteínas de origen natural, así como recombinantes, se utilizan en la presente invención.

[0064] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «proteína» designa cualquier composición que comprende aminoácidos y que está reconocida como una proteína por los expertos en la materia. Los términos «proteína», «péptido» y «polipéptido» se usan indistintamente en la presente memoria. En los casos en que un péptido sea una porción de una proteína, los expertos en la materia entenderán el uso del término en contexto.

[0065] En el sentido en que se usa en la presente memoria, las proteínas funcional y/o estructuralmente similares se considera que son «proteínas relacionadas». En algunas formas de realización, estas proteínas derivan de un género y/o especie diferente, lo que incluye diferencias entre clases de organismos (por ejemplo, una proteína bacteriana y una proteína fúngica). En algunas formas de realización, estas proteínas derivan de un género y/o especie diferente, lo que incluye diferencias entre clases de organismos (por ejemplo, una enzima bacteriana y una enzima fúngica). En formas de realización adicionales, se proporcionan proteínas relacionadas de la misma especie. De hecho, no se pretende que la presente invención esté limitada a proteínas relacionadas de ninguna fuente o fuentes en concreto. Además, el término «proteínas relacionadas» abarca homólogos de estructura terciaria y homólogos de estructura primaria (por ejemplo, la metaloproteasa neutra de la presente invención). Por ejemplo, la presente invención abarca dichos homólogos como los que se proporcionan en las Figuras 3-5. Se contemplan homólogos adicionales que incluyen, sin carácter limitativo, enzimas de metaloproteasa obtenidas a partir de *B. cereus*, *B. cereus* E33L, *B. caldolyticus*, *B. pumilis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *amylosacchariticus*, *Brevibacillus brevis*, *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*), *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* y *S. aureus*, así como aureolisina, elastasa extracelular y proteasa neutra B. En formas de realización adicionales, el término abarca proteínas que reaccionan inmunitariamente de forma cruzada.

[0066] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «derivado» designa una proteína que deriva de otra proteína por medio de la adición de uno o más aminoácidos a cualquiera o ambos de los extremos C- y N-terminales, la sustitución de uno o más aminoácidos en uno o en una serie de sitios diferentes en la secuencia de aminoácidos, y/o la delección de uno o más aminoácidos en cualquiera o ambos extremos de la proteína o en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos, y/o la inserción de uno o más aminoácidos en

uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos. La preparación de un derivado de proteína se logra preferentemente al modificar una secuencia de ADN que codifica la proteína nativa, transformar esa secuencia de ADN en un hospedador adecuado y expresar la secuencia de ADN modificada para formar la proteína derivada.

[0067] Las proteínas relacionadas (y derivadas) comprenden «variantes de proteína». En algunas formas de realización preferentes, las variantes de proteína difieren de una proteína original y entre sí por un pequeño número de residuos de aminoácido. El número de residuos de aminoácido diferentes puede que sea uno o más, preferentemente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más residuos de aminoácido. En algunas formas de realización preferentes, el número de aminoácidos diferentes entre variantes es de entre 1 y 10. En algunas formas de realización preferentes en concreto, las proteínas relacionadas y las variantes de proteína en concreto comprenden al menos un 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos. De manera adicional, una proteína relacionada o variante de proteína en el sentido en que se usa en la presente memoria, designa una proteína que difiere de otra proteína relacionada o de una proteína original en el número de regiones prominentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las variantes de proteína presentan 1, 2, 3, 4, 5 o 10 regiones prominentes correspondientes que difieren de la proteína original.

[0068] Son conocidos varios métodos en la técnica que son adecuados para generar variantes de las enzimas de la presente invención, lo que incluye, sin carácter limitativo, mutagénesis por saturación de sitio, mutagénesis de barrido, mutagénesis insercional, mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida y evolución dirigida, así como otros diversos enfoques recombinatorios.

[0069] La caracterización de las proteínas naturales y mutantes se consigue mediante cualquier medio adecuado y está basada preferentemente en la valoración de las propiedades de interés. Por ejemplo, se determina(n) el pH y/o la temperatura, así como la estabilidad del detergente y/o frente a la oxidación en algunas formas de realización de la presente invención. De hecho, se contempla que se utilizarán enzimas que presenten diversos grados de estabilidad en una o varias de estas características (pH, temperatura, estabilidad proteolítica, estabilidad del detergente y/o estabilidad frente a la oxidación).

[0070] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «vector de expresión» designa una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está enlazada operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un hospedador adecuado. Dichas secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión a ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede que sea un plásmido, una partícula de fago o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede que se replique y funcione independientemente del genoma del hospedador o, en algunos casos, puede que se integre en el genoma mismo. En la presente memoria, «plásmido», «plásmido de expresión» y «vector» se usan a menudo indistintamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector en la actualidad. Sin embargo, se pretende que la invención incluya dichas otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que son, o se han vuelto, conocidas en la técnica.

[0071] En algunas formas de realización preferentes, el gen de metaloproteasa neutra está ligado en un plásmido de expresión apropiado. El gen de metaloproteasa neutra clonado se usa entonces para transformar o transfectar una célula hospedadora para expresar el gen de metaloproteasa neutra. Este plásmido puede que se replique en hospedadores en el sentido de que contiene los elementos bien conocidos necesarios para la replicación del plásmido, o el plásmido puede que se diseñe para integrarse en el cromosoma del hospedador. Se proporcionan los elementos necesarios para una expresión génica eficaz (por ejemplo, un promotor enlazado operativamente al gen de interés). En algunas formas de realización, se suministran estos elementos necesarios en forma del promotor homólogo del propio gen si es reconocido (es decir, transcrito), por el hospedador, y un terminador de la transcripción (una región de poliadenilación para células hospedadoras eucarióticas) que es exógeno o se suministra por la región terminadora endógena del gen de metaloproteasa neutra. En algunas formas de realización, también se incluye un gen de selección como un gen de resistencia a los antibióticos que posibilita el mantenimiento en cultivo continuo de células hospedadoras infectadas por plásmidos por medio del cultivo en un medio que contiene antimicrobianos.

[0072] Puede que se utilice el siguiente método de mutagénesis por inserción de un casete para facilitar la construcción de las variantes de metaloproteasa neutra de la presente invención, aunque puede que se utilicen otros métodos. En primer lugar, como se describe en la presente memoria, se obtiene y se secuencian total o parcialmente un gen de origen natural que codifica la metaloproteasa neutra. Se examina entonces la secuencia en busca de un punto en que se desea hacer una mutación (deleción, inserción o sustitución) de uno o varios aminoácidos en la metaloproteasa neutra codificada. Las secuencias que flanquean este punto se evalúan en busca de la presencia de sitios de restricción para reemplazar un segmento corto del gen por un conjunto de oligonucleótidos que, cuando se expresa, codificará diversos mutantes. Dichos sitios de restricción son

preferentemente sitios únicos en el gen de la proteína, para facilitar el reemplazo del segmento génico. No obstante, puede que se utilice cualquier sitio de restricción conveniente que no sea excesivamente redundante en el gen de metaloproteasa neutra, siempre que los fragmentos génicos generados por la digestión de restricción puedan ensamblarse de nuevo en la secuencia apropiada. Si los sitios de restricción no están presentes en localizaciones a una distancia conveniente del punto seleccionado (de 10 a 15 nucleótidos), se generan dichos sitios por medio de la sustitución de nucleótidos en el gen de tal modo que ni el marco de lectura ni los aminoácidos codificados cambien en la construcción final. La mutación del gen para cambiar su secuencia para conformar la secuencia deseada se consigue mediante una extensión con el cebador M13 de acuerdo con procedimientos conocidos en general. La tarea de localizar las regiones flanqueantes adecuadas y de evaluar los cambios necesarios para llegar a dos secuencias de sitio de restricción convenientes se convierte en rutinaria por medio de la redundancia del código genético, un mapa de enzimas de restricción del gen y el gran número de enzimas de restricción diferentes. Cabe observar que si está disponible un sitio de restricción flanqueante conveniente, el método anterior tiene que usarse únicamente con respecto a la región flanqueante que no contiene un sitio.

[0073] Una vez que se clona el ADN de origen natural y/o ADN sintético, se digieren los sitios de restricción que flanquean las posiciones que van a mutarse con las enzimas de restricción asociadas y se liga en el gen una pluralidad de casetes de oligonucleótidos complementarios de los extremos. La mutagénesis se simplifica mediante este método porque todos los oligonucleótidos pueden sintetizarse para que tengan los mismos sitios de restricción, y no son necesarios enlazadores sintéticos para crear los sitios de restricción.

[0074] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «correspondiente a» designa un residuo en la posición enumerada en una proteína o péptido, o un residuo que es análogo, homólogo o equivalente a un residuo enumerado en una proteína o péptido.

[0075] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «región correspondiente» designa en general una posición análoga en proteínas relacionadas o en una proteína original.

[0076] Los términos «molécula de ácido nucleico que codifica», «secuencia de ácido nucleico que codifica», «secuencia de ADN que codifica» y «ADN que codifica» designan el orden o secuencia de desoxirribonucleótidos en una hebra de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos en la cadena polipeptídica (proteína). Por tanto, la secuencia de ADN codifica la secuencia de aminoácidos.

[0077] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «secuencia análoga» designa una secuencia en una proteína que proporciona una función, estructura terciaria y/o residuos conservados similares a la proteína de interés (es decir, normalmente la proteína de interés original). Por ejemplo, en regiones epitópicas que contienen una estructura de hélice alfa o lámina beta, los aminoácidos de reemplazo en la secuencia análoga mantienen preferentemente la misma estructura específica. El término también designa las secuencias de nucleótidos, así como las secuencias de aminoácidos. En algunas formas de realización, se desarrollan secuencias análogas de modo que los aminoácidos de reemplazo dan lugar a una variante enzimática que muestra una función similar o mejorada. En algunas formas de realización preferentes, la estructura terciaria y/o residuos conservados de los aminoácidos de la proteína de interés están localizados en o cerca del segmento o fragmento de interés. Por tanto, cuando el segmento o fragmento de interés contiene, por ejemplo, una estructura de hélice alfa o lámina beta, los aminoácidos de reemplazo mantienen preferentemente dicha estructura específica.

[0078] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «proteína homóloga» designa una proteína (por ejemplo, metaloproteasa neutra) que tiene una acción y/o estructura similares a una proteína de interés (por ejemplo, una metaloproteasa neutra de otra fuente). No se pretende necesariamente que los homólogos estén relacionados evolutivamente. Por tanto, se pretende que el término abarque la misma enzima o enzimas o similar o similares (es decir, en términos de estructura y función) obtenidas de distintas especies. En algunas formas de realización preferentes, es deseable identificar un homólogo que tenga una estructura cuaternaria, terciaria y/o primaria similar a la proteína de interés, ya que el reemplazo del segmento o fragmento en la proteína de interés por un segmento análogo del homólogo reducirá la inestabilidad del cambio.

[0079] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «genes homólogos» designa al menos un par de genes de distintas especies, siendo correspondientes dichos genes entre sí y siendo idénticos o muy similares entre sí. El término abarca genes que están separados por especiación (es decir, el desarrollo de nuevas especies) (por ejemplo, genes ortólogos), así como genes que se han separado por duplicación genética (por ejemplo, genes parálogos). Estos genes codifican «proteínas homólogas».

[0080] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «ortólogo» y «genes ortólogos» designan genes de distintas especies que han evolucionado a partir de un gen ancestral común (es decir, un gen homólogo) por especiación. Normalmente, los ortólogos retienen la misma función en el transcurso de la evolución. La

identificación de los ortólogos se utiliza en la predicción fiable de la función génica en genomas recién secuenciados.

[0081] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «parálogo» y «genes parálogos» designan genes que están relacionados por duplicación en un genoma. Mientras que los ortólogos retienen la misma función a lo largo del transcurso de la evolución, los parálogos desarrollan nuevas funciones, aunque algunas funciones están a menudo relacionadas con la original. Ejemplos de genes parálogos incluyen, sin carácter limitativo, los genes que codifican tripsina, quimotripsina, elastasa y trombina, que son todas proteasas serínicas y aparecen conjuntamente en la misma especie.

[0082] En el sentido en que se usa en la presente memoria, las proteínas «naturales» y «nativas» son aquellas que se encuentran en la naturaleza. Los términos «secuencia natural» y «gen natural» se usan indistintamente en la presente memoria para designar una secuencia que es nativa o de origen natural en una célula hospedadora. En algunas formas de realización, la secuencia natural designa una secuencia de interés que es el punto de partida de un proyecto de ingeniería de proteínas. Los genes que codifican la proteína de origen natural puede que se obtengan de acuerdo con los métodos generales conocidos por los expertos en la materia. En general, los métodos comprenden la síntesis de sondas marcadas que presentan secuencias que codifican presuntamente regiones de la proteína de interés, la preparación de genotecas genómicas a partir de organismos que expresan la proteína y el cribado de las genotecas en busca del gen de interés mediante hibridación con las sondas. A continuación, se cartografían y secuencian los clones de hibridación positiva.

[0083] El término «molécula de ADN recombinante», en el sentido en que se usa en la presente memoria, designa una molécula de ADN que está comprendida de segmentos de ADN unidos conjuntamente mediante técnicas de biología molecular.

[0084] El término «oligonucleótido recombinante» designa un oligonucleótido creado por medio de manipulaciones de biología molecular que incluyen, sin carácter limitativo, el ligamiento de dos o más secuencias de oligonucleótidos generadas por digestión con enzimas de restricción de una secuencia de polinucleótidos, la síntesis de oligonucleótidos (por ejemplo, la síntesis de cebadores u oligonucleótidos) y similares.

[0085] El grado de identidad entre secuencias de aminoácidos se determina por medio del algoritmo BLAST, descrito por Altschul *et al.*, (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, [1990]; y Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 [1993]). Un programa BLAST que resulta especialmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase Altschul *et al.*, *Meth. Enzymol.* 266:460-480 [1996]). Los parámetros «W», «T» y «X» determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa de manera predeterminada una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 [1989]), alineamientos (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M'5, N'-4, y una comparación de ambas hebras.

[0086] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «identidad porcentual (%) de secuencia de ácido nucleico» se define como el porcentaje de residuos nucleotídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos nucleotídicos de la secuencia.

[0087] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «hibridación» designa el proceso mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria mediante apareamiento de bases, como se conoce en la técnica.

[0088] En el sentido en que se usa en la presente memoria, la frase «condiciones de hibridación» designa las condiciones en que se realizan las reacciones de hibridación. Estas condiciones se clasifican normalmente por el grado de «rigor» de las condiciones en que se mide la hibridación. El grado de rigor puede estar basado, por ejemplo, en la temperatura de fusión (T_m) del complejo o sonda de unión a ácido nucleico. Por ejemplo, el «rigor máximo» aparece normalmente a aproximadamente T_m-5 °C (5 °C por debajo de la T_m de la sonda); el «rigor alto» a aproximadamente 5-10 °C por debajo de la T_m; el «rigor intermedio» a aproximadamente 10-20 °C por debajo de la T_m de la sonda; y el «rigor bajo» a aproximadamente 20-25 °C por debajo de la T_m. De manera alternativa, o adicionalmente, las condiciones de hibridación pueden estar basadas en las condiciones de sal o fuerza iónica de la hibridación y/o uno o varios lavados de rigor. Por ejemplo, 6xSSC = rigor muy bajo; 3xSSC = rigor bajo a medio; 1xSSC = rigor medio; y 0.5xSSC = rigor alto. Funcionalmente, las condiciones de rigor máximo puede que se usen para identificar secuencias de ácido nucleico que presentan una identidad estricta o casi estricta con la sonda de hibridación, mientras que las condiciones de rigor alto se usan para identificar secuencias de ácido nucleico que presentan aproximadamente un 80 % o más de identidad de secuencia con la sonda.

[0089] Para aplicaciones que requieran una alta selectividad, es normalmente deseable usar unas condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos (por ejemplo, se usan condiciones de contenido relativamente bajo de sal y/o alta temperatura).

[0090] Las frases «sustancialmente similar» y «sustancialmente idéntico» en el contexto de al menos dos ácidos nucleicos o polipéptidos significan normalmente que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que presenta al menos aproximadamente un 40 % de identidad, más preferentemente al menos aproximadamente un 50 % de identidad, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 60 % de identidad, preferentemente al menos aproximadamente un 75 % de identidad, más preferentemente al menos aproximadamente un 80 % de identidad, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, todavía más preferentemente aproximadamente un 95 %, siendo lo más preferente aproximadamente un 97 % de identidad, a veces del orden de aproximadamente un 98 % y de aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia, en comparación con la secuencia de referencia (es decir, natural). El *software* para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information. También puede que se busque en bases de datos por medio de FASTA (Pearson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448 [1988]). Un indicativo de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido reacciona inmunitariamente de forma cruzada con el segundo polipéptido. Normalmente, los polipéptidos que difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras reaccionan inmunitariamente de forma cruzada. Por tanto, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente en una sustitución conservadora. Otro indicativo de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas (por ejemplo, en un intervalo de rigor medio a alto).

[0091] En el sentido en que se usa en la presente memoria, «residuos equivalentes» designa proteínas que comparten unos residuos de aminoácido concretos. Por ejemplo, puede que los residuos equivalentes se identifiquen al determinar la homología a nivel de estructura terciaria para una proteína (por ejemplo, metaloproteasa neutra) cuya estructura terciaria se haya determinado por cristalografía de rayos X. Los residuos equivalentes se definen como aquellos para los que las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido concreto de la proteína que tiene presuntamente restos equivalentes y la proteína de interés (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están a 0.13 nm y preferiblemente 0.1 nm después del alineamiento. El alineamiento se logra después de orientar y colocar el mejor modelo para dar la superposición máxima de las coordenadas atómicas de los átomos de proteína no de hidrógeno de las proteínas analizadas. El modelo preferente es el modelo cristalográfico, que da el menor factor R para los datos de difracción experimental a la mayor resolución disponible, determinados por medio de métodos conocidos por los expertos en la materia de la cristalografía y la caracterización/análisis de las proteínas.

[0092] En el sentido en que se usa en la presente memoria, los términos «metaloproteasas neutras híbridas» y «metaloproteasas neutras de fusión» designan proteínas que se modifican por ingeniería genética a partir de al menos dos proteínas diferentes u «originales». En formas de realización preferentes, estas proteínas originales son homólogas entre sí. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una metaloproteasa neutra híbrida o proteína de fusión preferente contiene el extremo N-terminal de una proteína y el extremo C-terminal de un homólogo de la proteína. En algunas formas de realización preferentes, los dos extremos terminales se combinan para corresponder a la proteína activa completa.

[0093] El término «elemento regulador», en el sentido en que se usa en la presente memoria, designa un elemento genético que controla algunos aspectos de la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor es un elemento regulador que facilita la iniciación de la transcripción de una región de codificación enlazada operativamente. Los elementos reguladores adicionales incluyen señales de corte y empalme, señales de poliadenilación y señales de terminación.

[0094] En el sentido en que se usa en la presente memoria, las «células hospedadoras» son generalmente hospedadores procarióticos o eucarióticos que se transforman o transfectan con vectores contruidos por medio de técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Las células hospedadoras transformadas son capaces de replicar vectores que codifican las variantes de proteína o de expresar la variante de proteína deseada. En el caso de vectores que codifican la forma pre o prepro de la variante de proteína, dichas variantes, cuando se expresan, se secretan normalmente de la célula hospedadora al medio de la célula hospedadora.

[0095] El término «introducido», en el contexto de insertar una secuencia de ácido nucleico en una célula, significa transformación, transducción o transfección. Los medios de transformación incluyen transformación de protoplastos, precipitación con cloruro de calcio, electroporación, ADN desnudo y similares según se conoce en la técnica (véanse Chang y Cohen, *Mol. Gen. Genet.*, 168: 111-115 [1979]; Smith *et al.*, *Appl. Env. Microbiol.*, 51: 634 [1986] y el artículo de revisión de Ferrari *et al.*, en Harwood, *Bacillus*, Plenum Publishing Corporation, págs. 57-72 [1989]).

[0096] El término «promotor/potenciador» denota un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar funciones tanto promotoras como potenciadoras (por ejemplo, las repeticiones terminales largas de retrovirus contienen tanto funciones promotoras como potenciadoras). El potenciador/promotor puede que sea «endógeno» o «exógeno» o «heterólogo». Un potenciador/promotor endógeno es aquel que está enlazado naturalmente a un gen determinado en el genoma. Un potenciador/promotor exógeno (heterólogo) es aquel que se dispone adyacente a un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular).

[0097] La presencia de «señales de corte y empalme» en un vector de expresión a menudo da lugar a mayores niveles de expresión del transcrito recombinante. Las señales de corte y empalme median la retirada de intrones del transcrito de ARN primario y consisten en un sitio donador y aceptor de corte y empalme (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York [1989], págs. 16.7-16.8). Un sitio donador y aceptor de corte y empalme usado comúnmente es la zona de unión del ARN 16S de SV40.

[0098] El término «transfección estable» o «transfectado establemente» designa la introducción e integración de ADN extraño en el genoma de la célula transfectada. El término «transfectante estable» designa una célula que ha integrado de manera estable ADN extraño o exógeno en el ADN genómico de la célula transfectada.

[0099] Los términos «marcador seleccionable» o «producto génico seleccionable», en el sentido en que se usan en la presente memoria, designan el uso de un gen que codifica una actividad enzimática que confiere resistencia a un antibiótico o fármaco en la célula en que se expresa el marcador seleccionable.

[0100] En el sentido en que se usan en la presente memoria, los términos «amplificación» y «amplificación génica» designan un proceso mediante el cual se replican desproporcionadamente secuencias de ADN específicas de modo que el gen amplificado se hace presente en un número mayor de copias que el que estaba presente al principio en el genoma. En algunas formas de realización, la selección de células mediante cultivo en presencia de un fármaco (por ejemplo, un inhibidor de una enzima que se puede inhibir) da lugar a la amplificación del gen endógeno que codifica el producto génico necesario para el cultivo en presencia del fármaco o a la amplificación de secuencias exógenas (es decir, de entrada) que codifican este producto génico, o a ambas. La selección de células mediante cultivo en presencia de un fármaco (por ejemplo, un inhibidor de una enzima que se puede inhibir) puede que dé lugar a la amplificación del gen endógeno que codifica el producto génico necesario para el cultivo en presencia del fármaco o a la amplificación de secuencias exógenas (es decir, de entrada) que codifican este producto génico, o a ambas.

[0101] «Amplificación» es un caso especial de replicación de ácido nucleico que implica la especificidad de molde. Ha de contrastarse con la replicación de molde no específica (es decir, replicación que es dependiente de molde pero que no depende de un molde específico). La especificidad de molde se distingue aquí de la fidelidad de replicación (es decir, la síntesis de la secuencia de polinucleótidos apropiada) y de la especificidad de nucleótido (ribo o desoxirribo). La especificidad de molde se describe frecuentemente en términos de especificidad de «diana». Las secuencias diana son «dianas» en el sentido de que se busca diferenciarlas de otros ácidos nucleicos. Las técnicas de amplificación se han diseñado principalmente para esta diferenciación.

[0102] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «amplificación simultánea» designa la introducción en una sola célula de un marcador amplificable junto con otras secuencias de genes (es decir, que comprenden uno o más genes no seleccionables como los contenidos en un vector de expresión) y a la aplicación de una presión selectiva apropiada de modo que la célula amplifique tanto el marcador amplificable como las otras secuencias de genes no seleccionables. El marcador amplificable puede que esté enlazado físicamente a las otras secuencias de genes o, de manera alternativa, puede que se introduzcan en la misma célula dos trozos separados de ADN, uno que contenga el marcador amplificable y el otro que contenga el marcador no seleccionable.

[0103] En el sentido en que se usan en la presente memoria, los términos «marcador amplificable», «gen amplificable» y «vector de amplificación» designan un marcador, gen o vector que codifica un gen que permite la amplificación de dicho gen en condiciones de cultivo apropiadas.

[0104] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «ácido nucleico amplificable» designa ácidos nucleicos que puede que se amplifiquen por medio de cualquier método de amplificación. Se contempla que el «ácido nucleico amplificable» comprenderá habitualmente el «molde de muestra».

[0105] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «molde de muestra» designa el ácido nucleico que se origina de una muestra que se analiza en busca de la presencia de «diana» (definida más adelante). En contraposición, «molde de fondo» se usa en referencia a un ácido nucleico distinto del molde de muestra que puede que esté presente o no en una muestra. Lo más habitual es que el molde de fondo pase inadvertido. Puede que sea el resultado del arrastre, o puede que se deba a la presencia de contaminantes de

ácido nucleico que se busca purificar de la muestra. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de organismos distintos de los que se quieren detectar puede que estén presentes como fondo en una muestra de prueba.

[0106] La «especificidad de molde» se logra en la mayoría de técnicas de amplificación mediante la elección de enzima. Las enzimas de amplificación son enzimas que, en las condiciones en que se usan, procesarán solo secuencias específicas de ácido nucleico en una mezcla heterogénea de ácido nucleico. Por ejemplo, en el caso de la replicasa Q β , el ARN de MDV-1 es el molde específico para la replicasa (véase, por ejemplo, Kacian *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 3038 [1972]). El resto de ácidos nucleicos no se replican por medio de esta enzima de amplificación. De forma similar, en el caso del ARN polimerasa de T7, esta enzima de amplificación presenta una especificidad rigurosa para sus propios promotores (véase Chamberlin *et al.*, *Nature* 228: 227 [1970]). En el caso del ADN ligasa de T4, la enzima no ligará los dos oligonucleótidos o polinucleótidos cuando haya una falta de correspondencia entre el sustrato de oligonucleótidos o polinucleótidos y el molde en la zona de ligamiento (véase Wu y Wallace, *Genomics* 4: 560 [1989]). Finalmente, las polimerasas *Taq* y *Pfu*, en virtud de su capacidad de funcionar a alta temperatura, se encuentra que exhiben una alta especificidad por las secuencias unidas y por tanto definidas por los cebadores; la alta temperatura da lugar a condiciones termodinámicas que favorecen la hibridación del cebador con las secuencias diana y no la hibridación con las secuencias no diana.

[0107] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «cebador» designa un oligonucleótido, ya sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o que esté producido de forma sintética, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se pone en condiciones en que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario de una hebra de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente de inducción como por ejemplo ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es preferentemente monocatenario para una eficacia máxima en la amplificación, pero de manera alternativa puede que sea bicatenario. Si es bicatenario, en primer lugar se trata el cebador para separar sus hebras antes de utilizarse para preparar productos de extensión. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, entre los que se incluye la temperatura, fuente de cebador y el uso del método.

[0108] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «sonda» designa un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o que esté producido de forma sintética, recombinante o mediante amplificación por PCR, que es capaz de hibridar con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede que sea monocatenaria o bicatenaria. Las sondas resultan de utilidad en la detección, identificación y aislamiento de secuencias de genes concretas. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente invención estará marcada con cualquier «molécula informadora» de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema de detección ni marca en concreto.

[0109] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «diana», cuando se usa en referencia a métodos de amplificación (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa), designa la región del ácido nucleico unida por los cebadores y utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa. Por tanto, se busca diferenciar la «diana» de otras secuencias de ácido nucleico. Un «segmento» se define como una región de ácido nucleico en la secuencia diana.

[0110] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «reacción en cadena de la polimerasa» («PCR») designa los métodos de las patentes de los Estados Unidos n.ºs 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, que incluyen métodos para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación ni purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana consiste en la introducción de un gran exceso de dos cebadores de oligonucleótidos en la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido de una secuencia precisa de ciclación térmica en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios de sus respectivas hebras de la secuencia diana bicatenaria. Para efectuar la amplificación, se desnaturaliza la mezcla y los cebadores se aparean entonces con sus secuencias complementarias en la molécula diana. Después del apareamiento, los cebadores se extienden con una polimerasa para formar un nuevo par de hebras complementarias. Las etapas de desnaturalización, apareamiento de cebador y extensión con polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, desnaturalización, apareamiento y extensión constituyen un «ciclo»; puede haber numerosos «ciclos») para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina por medio de las posiciones relativas de los cebadores entre sí y, por lo tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto repetitivo del proceso, el método se denomina «reacción en cadena de la polimerasa» (en lo sucesivo, «PCR»). Debido a que

los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se vuelven las secuencias predominantes (en términos de concentración) en la mezcla, se dice que están «amplificados por PCR».

[0111] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «reactivos de amplificación» designa aquellos reactivos (trifosfatos de desoxirribonucleótido, tampón, etc.) necesarios para la amplificación salvo los cebadores, el molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Normalmente, los reactivos de amplificación junto con los demás componentes de reacción están dispuestos y contenidos en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

[0112] Con la PCR, es posible amplificar una sola copia de una secuencia diana específica en ADN genómico a un nivel detectable mediante varias metodologías diferentes (por ejemplo, hibridación con una sonda marcada; incorporación de cebadores biotinilados seguida de detección con conjugado de avidina-enzima; incorporación de trifosfatos de desoxinucleótidos marcados con ³²P, tales como dCTP o dATP, al segmento amplificado). Además del ADN genómico, puede amplificarse cualquier secuencia de oligonucleótidos o polinucleótidos con el conjunto apropiado de moléculas cebadoras. En concreto, los segmentos amplificados creados por el proceso mismo de PCR son, a su vez, moldes eficaces para posteriores amplificaciones por PCR.

[0113] En el sentido en que se usa en la presente memoria, los términos «producto de PCR», «fragmento de PCR» y «producto de amplificación» designan la mezcla de compuestos resultante después de completar dos o más ciclos de las etapas de PCR de desnaturalización, apareamiento y extensión. Estos términos abarcan el caso en que ha habido amplificación de uno o más segmentos de una o más secuencias diana.

[0114] En el sentido en que se usa en la presente memoria, los términos «endonucleasas de restricción» y «enzimas de restricción» designan enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

[0115] La presente invención proporciona una enzima de metaloproteasa neutra que presenta una actividad o estabilidad mejorada. En algunas formas de realización, la metaloproteasa neutra se utiliza en aplicaciones que incluyen, sin carácter limitativo, limpieza, blanqueo y desinfección.

[0116] Asimismo, tal y como se describe con más detalle en los Ejemplos más adelante, la presente invención proporciona muchas ventajas para la limpieza de una amplia variedad de objetos, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, ropa, telas, productos sanitarios, etc. Además, la presente invención proporciona composiciones que son eficaces en la limpieza, blanqueo y desinfección, en un intervalo de temperaturas y pH de lavado.

[0117] En general, las proteasas hidrolizan ligamientos amidas de proteínas mediante la adición de una molécula de agua al enlace o enlaces peptídicos. El corte sucede en el grupo carbonilo del enlace peptídico. En especies bacterianas como *Bacillus*, existen dos clases principales de proteasas extracelulares, concretamente proteasas alcalinas o serínicas y metaloproteasas neutras.

[0118] Las metaloendopeptidasas neutras (es decir, metaloproteasas neutras) (EC 3.4.24.4) pertenecen a una clase de proteasas que necesita de manera imprescindible iones de cinc para su actividad catalítica. Estas enzimas están óptimamente activas a un pH neutro y se encuentran en el intervalo de tamaño de 30 a 40 kDa. Las metaloproteasas neutras se unen a entre dos y cuatro iones de calcio que contribuyen a la estabilidad estructural de la proteína. El ión metálico unido en el centro activo de las metaloproteasas es una característica fundamental que permite la activación de una molécula de agua. La molécula de agua actúa entonces como el nucleófilo y corta el grupo carbonilo del enlace peptídico.

[0119] La familia de metaloproteasas neutras de unión a cinc incluye la enzima bacteriana termolisina, y proteasas similares a la termolisina («TLP»), así como carboxipeptidasa A (una enzima digestiva) y las metaloproteasas de matriz que catalizan las reacciones en la remodelación y degradación tisulares. De estas proteasas, la única bien caracterizada en cuanto a estabilidad y función es la termolisina y sus variantes (TLP). De hecho, gran parte de las investigaciones se han centrado en la modificación por ingeniería genética de las proteasas neutras de *Bacillus subtilis* para aumentar la estabilidad térmica de la enzima (véase, por ejemplo, Vriend *et al.*, In, Tweel *et al.* (eds), *Stability and Stabilization of enzymes*, Elsevier, págs. 93-99 [1993]).

[0120] La mayor parte de los esfuerzos se han centrado en aumentar la estabilidad de la proteasa al alterar los determinantes estructurales que se identifican en el uso de modelización molecular que se sugiere que evita los procesos de despliegue locales que darían lugar a la autólisis de la proteína y provocarían la desnaturalización de la proteasa neutra a altas temperaturas (véase, por ejemplo, van den Burg *et al.*, en Hopsu-Havu *et al.*, (eds),

«Proteolysis in Cell Functions Manipulating the Autolytic Pathway of a Bacillus Protease». *Biomedical and Health Research* Vol. 13, IOS Press [1997] pág. 576).

- 5 **[0121]** En la presente memoria se proporcionan composiciones y métodos para modificar por ingeniería genética metaloproteasas neutras con características mejoradas. Como se indica en el presente texto, se ha observado que, para otras proteasas como la termolisina, los iones de calcio evitan la autólisis. La proteasa neutra de *B. stearothermophilus* se ha estabilizado frente a la autólisis y la degradación proteolítica por medio de la adición de calcio (véase Dürschmidt *et al.*, *FEBS J.*, 272:1523-1534 [2005]).
- 10 **[0122]** De hecho, la presente invención proporciona composiciones y métodos adecuados para la modificación por ingeniería genética de metaloproteasas neutras que no dependen del calcio para mantener su estabilidad estructural. En algunas formas de realización, la modificación por ingeniería genética evita el despliegue local de un elemento estructural secundario en concreto que puede que evite la proteólisis.
- 15 **[0123]** Las proteasas naturales y las modificadas por ingeniería genética, como la subtilisina, a menudo se expresan en *Bacillus subtilis* y varias de ellas se han aplicado en formulaciones de detergente para eliminar manchas proteicas. Otras se han aplicado, por ejemplo, en la industria panadera (por ejemplo, termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus*; véase, por ejemplo, Galante y Formantici, *Curr. Organic Chem.*, 7, 1399-1422 [2003]). En general, las proteasas serénicas se han utilizado más ampliamente en detergentes, al menos
- 20 parcialmente debido a la relativa facilidad con que dichas proteasas pueden estabilizarse.
- [0124]** De hecho, las metaloproteasas se usan con menor frecuencia en la industria, y en concreto en la industria de los detergentes, por una serie de razones. Dichas enzimas implican unos sistemas proteicos más complejos, puesto que las enzimas necesitan de manera imprescindible iones de calcio y de cinc para su estabilidad y
- 25 función, respectivamente. Asimismo, la solución de detergente así como el agua usada en el proceso de colada a menudo contiene componentes que a menudo interfieren en la unión de los iones por parte de la enzima o que quelatan dichos iones, lo que da lugar a una disminución o pérdida de la función proteolítica y a la desestabilización de la proteasa.
- 30 **[0125]** En contraposición a los sistemas enzimáticos de metaloproteasa usados en la actualidad, la presente invención proporciona metaloproteasas neutras que están lo bastante estabilizadas como para facilitar el almacenamiento a largo plazo en estanterías en composiciones detergentes para ropa líquidas. En formas de realización preferentes en concreto, la estabilidad y actividad de la metaloproteasa se mantienen mediante la complejación de la enzima con su molécula de cinc en el centro activo obligatoria. Lo más importante es que la
- 35 combinación de iones de calcio y cinc no ocasiona un efecto perjudicial en la función de la enzima. En algunas formas de realización, la metaloproteasa neutra estabilizada es la metaloproteasa natural de *Bacillus amyloliquefaciens* (por ejemplo, MULTIFECT® Neutral purificada; «PMN»). En formas de realización alternativas preferentes, metaloproteasa neutra recombinante (por ejemplo, metaloproteasa neutra de *Bacillus amyloliquefaciens* clonada en *Bacillus subtilis* («nprE»)). En formas de realización adicionales, las
- 40 metaloproteasas con estabilidad mejorada abarcan enzimas con un aumento de afinidad por uno o varios de los sitios de unión a calcio de la enzima. En formas de realización preferentes, las metaloproteasas neutras de la presente invención se utilizan en aplicaciones de detergente en general, lo que incluye, sin carácter limitativo, temperaturas de agua fría, manchas de hierba y/o condiciones de pH bajo.
- 45 **[0126]** La presente exposición proporciona condiciones que estabilizan la metaloproteasa neutra de unión a cinc para aumentar la estabilidad en el almacenamiento en bases y/o composiciones de detergente. Las composiciones detergentes puede que comprendan al menos una metaloproteasa (por ejemplo, cualquier metaloproteasa neutra de *Bacillus*) que se estabiliza frente a la autólisis y el despliegue, por medio de la inclusión en la formulación de detergente de los iones de cinc y/o calcio esenciales.
- 50 **[0127]** A pesar de que algunos resultados experimentales indicaron que la nprE pierde parte de su actividad proteolítica (~ 20 %) una hora después de añadir la base de detergente, la nprE incubada a 32 °C en presencia de iones de cinc mostró una estabilización significativa en las condiciones de prueba, sin añadir sales o iones de calcio. La presencia tanto de iones de calcio como de cinc no mostró un efecto acumulativo. Con
- 55 concentraciones de iones de cinc inferiores a 15 mM, la metaloproteasa neutra es lo bastante estable a lo largo de 4 semanas aproximadamente. Por tanto, la adición de cinc puede que aumente la vida útil de almacenamiento de la metaloproteasa neutra en presencia de componentes de detergente.
- 60 **[0128]** Además, puede que el catión de cinc se reemplace por Co^{2+} , Mn^{2+} o Fe^{2+} , ya que todos estos iones han demostrado su capacidad de unirse y restablecer la actividad de proteasa de las metaloproteasas neutras. No obstante, se determinó que Mn^{2+} y Fe^{2+} no restablecen toda la actividad original. A pesar de que Co^{2+} restablece el mayor porcentaje de la actividad, parece ser que se une con menos firmeza que Zn^{2+} . El catión de cinc es una característica fundamental del centro activo de todas las metaloproteasas neutras, puesto que se conoce que desempeña una función en la unión de sustrato y en la catálisis enzimática (véase, por ejemplo, Holmquist y

Vallee, *J. Biol. Chem.*, 249:4601-4607 [1974]). La afinidad relativamente estrecha de la metaloproteasa neutra por el catión de cinc (intervalo $\sim \mu\text{M}$) y la afinidad aproximadamente 10 veces mayor por este ión respecto al calcio sugiere que el cinc funciona a modo de estabilizador, lo que evita de este modo la autólisis, la proteólisis y el despliegue. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada por ningún mecanismo en concreto.

[0129] La presente invención proporciona unas oportunidades extremadamente beneficiosas para su aplicación en la producción y desarrollo de detergentes industriales. Existen muchos detergentes con una alta especificidad hacia la eliminación de manchas proteicas, de almidón y de grasa. En concreto, el mejor rendimiento de lavado de la PMN o de la metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens* en Equest Grass (Warwick) indica que las metaloproteasas neutras de la presente invención en una base de detergente que también contenga cinc se utilizan en composiciones detergentes mejoradas.

Descripción detallada de las formulaciones limpiadoras y de detergente de la presente invención

[0130] Salvo que se señale de otro modo, todos los niveles de componente o composición que se proporcionan en la presente memoria se realizan en referencia al nivel activo de dicho componente o composición y no incluyen impurezas, como por ejemplo residuos de disolventes o subproductos, que puede que estén presentes en fuentes comercializadas.

[0131] Los pesos de los componentes enzimáticos están basados en la proteína activa total.

[0132] Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso salvo que se indique de otro modo. Todos los porcentajes y relaciones se calculan en función de la composición total salvo que se indique de otro modo.

[0133] En las composiciones detergentes de ejemplo, los niveles enzimáticos se expresan en enzima pura en peso de la composición total y, salvo que se especifique de otro modo, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales.

Composiciones limpiadoras que comprenden metaloproteasa neutra

[0134] Las metaloproteasas neutras estabilizadas de la presente invención resultan de utilidad en la formulación de diversas composiciones detergentes. La composición limpiadora de la presente invención puede que se emplee de manera ventajosa, por ejemplo, en aplicaciones de lavado de ropa, limpieza de superficies duras, aplicaciones de lavavajillas automático, así como en aplicaciones cosméticas como dentaduras postizas, dientes, cabello y piel. No obstante, debido a las ventajas singulares del aumento de eficacia en las soluciones a temperaturas inferiores y al perfil superior de conservación del color, las enzimas de la presente invención son adecuadas idealmente para aplicaciones de lavado de ropa como el blanqueo de telas. Además, las enzimas de la presente invención se utilizan tanto en composiciones granuladas como líquidas.

[0135] Las enzimas de la presente invención también se utilizan en productos aditivos de limpieza. Un producto aditivo de limpieza que incluya al menos una enzima de la presente invención es adecuado idealmente para su inclusión en un proceso de lavado cuando se desee una eficacia de blanqueo adicional. Dichos casos incluyen, sin carácter limitativo, aplicaciones de limpieza de solución a baja temperatura. El producto aditivo puede que sea, en su forma más sencilla, una o varias enzimas de metaloproteasa neutra según la presente invención. En algunas formas de realización, el aditivo se encuentra empaquetado en forma de dosis para ser añadido a un proceso de limpieza en el que se emplee una fuente de peróxigeno y se desee un aumento de la eficacia de blanqueo. En algunas formas de realización, la forma de dosis individual comprende una cápsula, pastilla, cápsula de gel u otra unidad de dosificación individual que incluye polvos y/o líquidos previamente medidos. En algunas formas de realización, se incluye un material o materiales de relleno y/o de vehículo para aumentar el volumen de dicha composición. Los materiales de relleno o de vehículo adecuados incluyen, sin carácter limitativo, diversas sales de sulfato, carbonato y silicato, así como talco, arcilla y similares. En algunas formas de realización, los materiales de relleno y/o de vehículo para composiciones líquidas incluyen agua y/o alcoholes primarios y secundarios de bajo peso molecular, incluyendo polioles y dioles. Ejemplos de dichos alcoholes incluyen, sin carácter limitativo, metanol, etanol, propanol e isopropanol. En algunas formas de realización, las composiciones comprenden de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 90 % de dichos materiales. En formas de realización adicionales, los rellenos ácidos se utilizan para reducir el pH de la composición. En algunas formas de realización adicionales, el aditivo de limpieza incluye al menos una fuente de peróxigeno activada como se describe más adelante y/o ingredientes auxiliares como se describe con mayor profundidad más adelante.

[0136] Las composiciones limpiadoras y aditivos de limpieza de la presente invención necesitan una cantidad eficaz de enzima de metaloproteasa neutra según la presente invención. En algunas formas de realización, el nivel necesitado de enzima se logra por medio de la adición de una o varias especies de metaloproteasa neutra

que proporciona la presente invención. Normalmente, las composiciones limpiadoras de la presente invención comprenden al menos un 0.0001 por ciento en peso, de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 1, de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.5 o incluso de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 por ciento en peso de al menos una metaloproteasa neutra que proporciona la presente invención.

[0137] En algunas formas de realización preferentes, las composiciones limpiadoras que se proporcionan en la presente memoria se formulan normalmente de modo que, durante su uso en operaciones de limpieza acuosas, el agua de lavado presenta un pH de 5.0 aproximadamente a 11.5 aproximadamente o, en formas de realización alternativas, incluso de 6.0 aproximadamente a 10.5 aproximadamente. En algunas formas de realización preferentes, las formulaciones de producto líquidas se formulan normalmente para que tengan un pH puro de 3.0 aproximadamente a 9.0 aproximadamente, mientras que en algunas formas de realización alternativas la formulación presenta un pH puro de 3 aproximadamente a 5 aproximadamente. En algunas formas de realización preferentes, los productos para el lavado de ropa granulados se formulan normalmente para que presenten un pH de 8 aproximadamente a 11 aproximadamente. Las técnicas para controlar el pH en los niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, álcalis, ácidos, etc., y son bien conocidas por los expertos en la materia.

[0138] En algunas formas de realización preferentes en concreto, cuando se emplea al menos una metaloproteasa neutra en una composición granulada o líquido, la metaloproteasa neutra se encuentra en forma de partícula encapsulada para proteger a la enzima de otros componentes de la composición granulada durante el almacenamiento. Además, el encapsulado es también un medio de controlar la disponibilidad de la(s) metaloproteasa(s) neutra(s) durante el proceso de limpieza y puede que potencie el rendimiento de la(s) metaloproteasa(s) neutra(s). Se contempla que las metaloproteasas neutras encapsuladas de la presente invención se utilizarán en diversas situaciones. También se pretende que la metaloproteasa neutra se encapsule mediante cualquier material(es) de encapsulado adecuado(s) y método(s) conocido(s) en la técnica.

[0139] En algunas formas de realización preferentes, el material de encapsulado normalmente encapsula al menos parte del catalizador de metaloproteasa neutra. En algunas formas de realización, el material de encapsulado es hidrosoluble y/o dispersable en agua. En algunas formas de realización adicionales, el material de encapsulado presenta una temperatura de transición vítrea (T_g) de 0 °C o mayor (véase, por ejemplo, el documento WO 97/11151, en concreto de la página 6, línea 25 a la página 7, línea 2, para saber más sobre las temperaturas de transición vítrea).

[0140] En algunas formas de realización, el material de encapsulado se selecciona entre el grupo que consiste en carbohidratos, gomas naturales o sintéticas, quitina y chitosán, celulosa y derivados de celulosa, silicatos, fosfatos, boratos, alcohol de polivinilo, polietilenglicol, ceras de parafina y combinaciones de estos. En algunas formas de realización en que el material de encapsulado es un carbohidrato, este se selecciona entre el grupo que consiste en monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y combinaciones de estos. En algunas formas de realización preferidas, el material de encapsulado es un almidón (véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 922 499; US 4.977.252; US 5.354.559 y US 5.935.826 para las descripciones de algunos almidones adecuados de ejemplo).

[0141] En formas de realización adicionales, el material de encapsulado comprende una microesfera hecha de plástico (por ejemplo, termoplástico, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, poliácrlonitrilo, polimetacrilonitrilo y mezclas de estos; las microesferas comercializadas que se utilizan incluyen, sin carácter limitativo, EXPANCEL® [Casco Products, Estocolmo, Suecia], PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES® y Q-CEL® [PQ Corp., Valley Forge, Pensilvania, EE. UU.], LUXSIL® y SPHERICEL1® [Potters Industries, Inc., Carlstadt, Nueva Jersey y Valley Forge, Pensilvania, EE. UU.]).

Procesos de elaboración y uso de la composición limpiadora de los solicitantes

[0142] En algunas formas de realización preferentes, las composiciones limpiadoras de la presente invención se formulan de cualquier forma adecuada y se preparan por medio de cualquier proceso elegido por el formulador (véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.879.584, U.S. 5.691.297, U.S. 5.574.005, U.S. 5.569.645, U.S. 5.565.422, U.S. 5.516.448, U.S. 5.489.392 y U.S. 5.486.303 para algunos ejemplos no limitativos). En algunas formas de realización en que se desee una composición limpiadora con un pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material ácido como HCl.

Materiales auxiliares

[0143] Aunque no son esenciales para los fines de la presente invención, en algunas formas de realización la lista no limitativa de auxiliares aquí descrita es adecuada para su uso en las composiciones limpiadoras de la presente invención. De hecho, en algunas formas de realización los auxiliares se incorporan a las composiciones limpiadoras de la presente invención. En algunas formas de realización, los materiales auxiliares ayudan y/o

potencian el rendimiento de limpieza, tratan el sustrato que va a ser limpiado y/o modifican la estética de la composición limpiadora (por ejemplo, perfumes, colorantes, tintes, etc.). Se entiende que dichos auxiliares son un añadido a las metaloproteasas neutras de la presente invención. La naturaleza precisa de dichos componentes adicionales, y sus niveles de incorporación, depende de la forma física de la composición y de la naturaleza de la operación de limpieza para la que se vaya a usar. Los materiales auxiliares adecuados incluyen, sin carácter limitativo, tensioactivos, adyuvantes, quelantes, inhibidores de la transferencia de tinte, auxiliares de deposición, dispersantes, enzimas adicionales y estabilizadores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores del blanqueo, potenciadores del blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de la suciedad de arcilla/antirredeposición, blanqueadores, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastificantes de la estructura, suavizantes de telas, vehículos, hidrótrofos, auxiliares de procesamiento y/o pigmentos. Además de los proporcionados de forma expresa en el presente texto, en la técnica se conocen ejemplos adicionales (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.ºs 5.576.282, 6.306.812 B1 y 6.326.348 B1). En algunas formas de realización, los ingredientes auxiliares anteriormente mencionados constituyen el resto de las composiciones limpiadoras de la presente invención.

[0144] Tensioactivos. En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención comprenden al menos un tensioactivo o sistema tensioactivo, donde el tensioactivo se selecciona entre tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfóteros, tensioactivos dipolares, tensioactivos no iónicos semipolares y mezclas de estos. En algunas formas de realización de composiciones limpiadoras con un pH bajo (por ejemplo, composiciones que presenten un pH puro de 3 aproximadamente a 5 aproximadamente), la composición no contiene normalmente sulfato de alquilo etoxilado, puesto que se cree que dicho tensioactivo puede que hidrolice por medio de dichas composiciones los contenidos ácidos.

[0145] En algunas formas de realización, el tensioactivo está presente a un nivel de un 0.1 % aproximadamente a un 60 % aproximadamente, mientras que en formas de realización alternativas, el nivel va de un 1 % aproximadamente a un 50 % aproximadamente, mientras que en otras formas de realización más, el nivel va de un 5 % aproximadamente a un 40 % aproximadamente en peso de la composición limpiadora.

[0146] Adyuvantes. En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención comprenden uno o varios adyuvantes de detergente o sistemas de adyuvante. En algunas formas de realización que incorporan al menos un adyuvante, las composiciones limpiadoras comprenden al menos un 1 % aproximadamente, de un 3 % aproximadamente a un 60 % aproximadamente o incluso de un 5 % aproximadamente a un 40 % aproximadamente de adyuvante en peso de la composición limpiadora.

[0147] Los adyuvantes incluyen, sin carácter limitativo, las sales de metal alcalino, amonio y alcanolamónio de polifosfatos, silicatos de metal alcalino, carbonatos de metal alcalinotérreo y alcalino, adyuvantes de aluminosilicato, compuestos de policarboxilato, hidroxipolicarboxilatos de éter, copolímeros de anhídrido maleico con etileno o vinilmetiléter, ácido 1, 3, 5-trihidroxi benceno-2, 4, 6-trisulfónico y ácido carboximetiloxisuccínico, las diversas sales de metal alcalino, de amonio y de amonio sustituido de ácidos poliacéticos como el ácido tetraacético de etilendiamina y el ácido nitrilotriacético, así como policarboxilatos como ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidisuccínico, ácido polimaleico, ácido de benceno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxisuccínico y sales solubles de estos. De hecho, se contempla que cualquier adyuvante adecuado se utilizará en diversas formas de realización de la presente invención.

[0148] Quelantes. En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención contienen al menos un quelante. Los quelantes adecuados incluyen, sin carácter limitativo, quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y mezclas de estos. En formas de realización en que se utiliza al menos un quelante, las composiciones limpiadoras de la presente invención comprenden de 0.1 % aproximadamente a 15 % aproximadamente o incluso de 3.0 % aproximadamente a 10 % aproximadamente de quelante en peso de la composición limpiadora en cuestión.

[0149] Auxiliar de deposición. En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención incluyen al menos un auxiliar de deposición. Los auxiliares de deposición adecuados incluyen, sin carácter limitativo, polietilenglicol, polipropilenglicol, policarboxilato, polímeros de liberación de la suciedad como el ácido politereftálico, arcillas como caolín, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita y mezclas de estas.

[0150] Inhibidores de la transferencia de tinte. En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención incluyen uno o varios inhibidores de la transferencia de tinte. Los inhibidores de la transferencia de tinte poliméricos adecuados incluyen, sin carácter limitativo, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de estos.

- [0151] En formas de realización en que se usa al menos un inhibidor de la transferencia de tinte, las composiciones limpiadoras de la presente invención comprenden de 0.0001 % aproximadamente a 10 % aproximadamente, de 0.01 % aproximadamente a 5 % aproximadamente, o incluso de 0.1 % aproximadamente a 3 % aproximadamente en peso de la composición limpiadora. **Dispersantes.** En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención contiene al menos un dispersante. Los materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen, sin carácter limitativo, los ácidos homopoliméricos o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.
- [0152] **Enzimas.** En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención comprenden una o varias enzimas de detergente que proporcionan beneficios en cuanto al rendimiento de limpieza y/o cuidado de las telas. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, sin carácter limitativo, hemicelulasas, peroxidases, proteasas, celulasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas, pectinasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanases, tanasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa y amilasas o mezclas de estas. En algunas formas de realización, se usa una combinación de enzimas (es decir, un «cóctel») que comprende enzimas aplicables convencionales como proteasa, lipasa, cutinasa y/o celulasa junto con amilasa.
- [0153] **Estabilizadores enzimáticos.** En algunas formas de realización de la presente invención, se estabilizan las enzimas usadas en las formulaciones de detergente de la presente invención. Se contempla que se utilizarán diversas técnicas para la estabilización enzimática en la presente invención. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las enzimas empleadas en la presente memoria se estabilizan por medio de la presencia de fuentes hidrosolubles de iones de cinc (II), calcio (II) y/o magnesio (II) en las composiciones acabadas que proporcionan dichos iones a las enzimas, así como otros iones metálicos (por ejemplo, bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II) y oxovanadio (IV)).
- [0154] **Complejos metálicos catalíticos.** En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención contienen uno o varios complejos metálicos catalíticos. En algunas formas de realización, se utiliza un catalizador blanqueante que contiene metal. En algunas formas de realización preferentes, el catalizador blanqueante metálico comprende un sistema de catalización que comprende un catión de metal de transición de una actividad catalítica blanqueante definida (por ejemplo, cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno o manganeso), un catión metálico auxiliar que presenta una actividad catalítica blanqueante mínima o nula (por ejemplo, cationes de cinc o aluminio) y un secuestrante que presenta unas constantes de estabilidad definidas para los cationes metálicos catalíticos y auxiliares, utilizándose en concreto ácido etilendiaminotetracético, ácido etilendiaminotetra (metilénfosfónico) y sus sales hidrosolubles (véase, por ejemplo, el documento U.S. 4.430.243).
- [0155] En algunas formas de realización, las composiciones limpiadoras de la presente invención se catalizan por medio de un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y los niveles de uso son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento U.S. 5.576.282).
- [0156] En formas de realización adicionales, los catalizadores blanqueantes de cobalto se utilizan en las composiciones limpiadoras de la presente invención. Los diversos catalizadores blanqueantes de cobalto son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.597.936 y U.S. 5.595.967). Dichos catalizadores de cobalto se preparan con facilidad mediante procedimientos conocidos (véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.597.936 y U.S. 5.595.967).
- [0157] En formas de realización adicionales, las composiciones limpiadoras de la presente invención incluyen un complejo de metal de transición de un ligando macropolícíclico rígido («MRL»). A modo práctico, y no a modo limitativo, en algunas formas de realización las composiciones y los procesos de limpieza que proporcionan la presente invención se ajustan para proporcionar del orden de al menos una parte por cien millones de la especie de MRL activa en el medio de lavado acuoso y, en algunas formas de realización, para proporcionar de 0.005 ppm aproximadamente a 25 ppm aproximadamente, más preferentemente de 0.05 ppm aproximadamente a 10 ppm aproximadamente y siendo lo más preferente de 0.1 ppm aproximadamente a 5 ppm aproximadamente del MRL en el agua de lavado.
- [0158] Los metales de transición preferentes en el presente catalizador blanqueante de metal de transición incluyen, sin carácter limitativo, manganeso, hierro y cromo. Los MRL preferentes también incluyen, sin carácter limitativo, ligandos ultrarápidos especiales que son de puente cruzado (por ejemplo, 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano). Los MRL de metal de transición adecuados se preparan con facilidad mediante procedimientos conocidos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 00/32601 y U.S. 6.225.464).

Procesos de elaboración y uso de las composiciones limpiadoras

[0159] Las composiciones limpiadoras de la presente invención se formulan de cualquier forma adecuada y se preparan por medio de cualquier proceso adecuado elegido por el formulador (véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.879.584, U.S. 5.691.297, U.S. 5.574.005, U.S. 5.569.645, U.S. 5.565.422, U.S. 5.516.448, U.S. 5.489.392, U.S. 5.486.303, U.S. 4.515.705, U.S. 4.537.706, U.S. 4.515.707, U.S. 4.550.862, U.S. 4.561.998, U.S. 4.597.898, U.S. 4.968.451, U.S. 5.565.145, U.S. 5.929.022, U.S. 6.294.514 y U.S. 6.376.445 para algunos ejemplos no limitativos).

Método de uso

[0160] En formas de realización preferentes, las composiciones limpiadoras de la presente invención se utilizan en la limpieza de superficies y/o telas. En algunas formas de realización, al menos una parte de la superficie y/o tela se pone en contacto con al menos una forma de realización de las composiciones limpiadoras de la presente invención, en su forma pura o diluida en un agua de lavado, y a continuación la superficie y/o tela se lava y/o aclara de manera opcional. A efectos de la presente invención, el «lavado» incluye, sin carácter limitativo, frotado y agitación mecánica. En algunas formas de realización, la tela comprende cualquier tela susceptible de ser lavada en condiciones de uso de consumidor normal. En formas de realización preferentes, las composiciones limpiadoras de la presente invención se usan en concentraciones de 500 ppm aproximadamente a 15 000 ppm aproximadamente en solución. En algunas formas de realización en que el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua normalmente oscila entre 5 °C aproximadamente y 90 °C aproximadamente. En algunas formas de realización preferentes para la limpieza de telas, la relación de masa agua/tela normalmente va de 1:1 aproximadamente a 30:1 aproximadamente.

PARTE EXPERIMENTAL

[0161] Los siguientes ejemplos se proporcionan con el objetivo de demostrar e ilustrar en mayor profundidad determinadas formas de realización y aspectos preferentes de la presente invención y no ha de interpretarse como que limitan el alcance de esta.

[0162] En la exposición experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: °C (grados centígrados); rpm (revoluciones por minuto); H₂O (agua); HCl (ácido clorhídrico); aa y AA (aminoácido); pb (par de bases); kb (kilo pares de bases); kD (kilodalton); g (gramos); µg y ug (microgramos); mg (miligramos); ng (nanogramos); µl y ul (microlitros); ml (mililitros); mm (milímetros); nm (nanómetros); µm y um (micrómetro); M (molar); mM (milimolar); µM y uM (micromolar); U (unidades); V (voltios); PM (peso molecular); s (segundos); min (minuto/minutos); h (hora/horas); MgCl₂ (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro de sodio); DO₂₈₀ (densidad óptica a 280 nm); DO₄₀₅ (densidad óptica a 405 nm); DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm); PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida); EtOH (etanol); PBS (solución salina fosfatada [150 mM de NaCl, 10 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 7.2]); LAS (laurilsulfonato de sodio); SDS (dodecilsulfato de sodio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); TAED (N,N,N',N'-tetraacetiletilendiamina); BES (poliestersulfona); MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico, monohidrato; peso fórmula 195.24; Sigma n.º M-3671); CaCl₂ (cloruro cálcico, anhidro; peso fórmula 110.99; Sigma n.º C-4901); DMF (N,N-dimetilformamida, peso fórmula 73.09, d = 0.95); Abz-AGLA-Nba (2-aminobenzoil-L-alanilglicil-L-leucil-L-alanino-4-nitrobencilamida, peso fórmula 583.65; Bachem n.º H-6675, VWR n.º catálogo 100040-598); SBG al 1 % («supercaldo con glucosa»; 6 g de Soytone [Difco], 3 g de extracto de levadura, 6 g de NaCl, 6 g de glucosa); el pH se ajustó a 7.1 con NaOH antes de la esterilización por medio de métodos conocidos en la técnica; p/v (peso a volumen); v/v (volumen a volumen); Npr y npr (metaloproteasa neutra); SEQUEST® (programa de búsqueda de bases de datos SEQUEST, Universidad de Washington); Npr y npr (gen de metaloproteasa neutra); nprE y NprE (metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens*); PMN (metaloproteasa MULTIFECT® purificada); EM (espectrometría de masas); SRI (índice de eliminación de manchas); TIGR (The Institute for Genomic Research, Rockville, MA); AATCC (American Association of Textile and Coloring Chemists); WFK (wfk Testgewebe GmbH, Bruggen-Bracht, Alemania); Amersham (Amersham Life Science, Inc. Arlington Heights, IL); Coming (Coming International, Coming, NY); ICN (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); Equest (Equest, Warwick International Group, Inc., Flintshire, Reino Unido); EMPA (Eidgenössische Material Prüfungs und Versuch Anstalt, St. Gallen, Suiza); CFT (Center for Test Materials, Vlaardingen, Países Bajos); Amicon (Amicon, Inc., Beverly, MA); ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA); Becton Dickinson (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ); Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Wellesley, MA); Rainin (Rainin Instrument, LLC, Woburn, MA); Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania); Waters (Waters, Inc., Milford, MA); Geneart (Geneart GmbH, Regensburg, Alemania); Perseptive Biosystems (Perseptive Biosystems, Ramsey, MN); Molecular Probes (Molecular Probes, Eugene, OR); BioRad (BioRad, Richmond, CA); Clontech (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA); Cargill (Cargill, Inc., Minneapolis, MN); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); New Brunswick (New Brunswick Scientific Company, Inc., Edison, NJ); Thermoelectron (Thermoelectron Corp., Waltham, MA); BMG (BMG Labtech, GmbH, Offenburg, Alemania); Greiner (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria); Novagen

(Novagen, Inc., Madison, WI); Novex (Novex, San Diego, CA); Finnzymes (Finnzymes OY, Finlandia) Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); DuPont Instruments (Asheville, NY); Global Medical Instrumentation o GMI (Global Medical Instrumentation; Ramsey, MN); MJ Research (MJ Research, Waltham, MA); Infors (Infors AG, Bottmingen, Suiza); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Roche (Hoffmann La Roche, Inc., Nutley, NJ); Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA); S-Matrix (S-Matrix Corp., Eureka, CA); US Testing (United States Testing Co., Hoboken, NY); West Coast Analytical Services (West Coast Analytical Services, Inc., Santa Fe Springs, CA); Ion Beam Analysis Laboratory (Ion Beam Analysis Laboratory, The University of Surrey Ion Beam Centre (Guildford, Reino Unido); TOM (Terg-o-Meter); BMI (sangre, leche, tinta); BaChem (BaChem AG, Bubendorf, Suiza); Molecular Devices (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA); Coming (Coming International, Coming, NY); MicroCal (Microcal, Inc., Northampton, MA); Chemical Computing (Chemical Computing Corp., Montreal, Canadá); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Argo Bioanalytica (Argo Bioanalytica, Inc., Nueva Jersey); Vydac (Grace Vydac, Hesperia, CA); Minolta (Konica Minolta, Ramsey, NJ); y Zeiss (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

[0163] En estos experimentos, se utilizó un espectrofotómetro para medir la absorbancia de los productos formados tras la finalización de las reacciones. Se utilizó un reflectómetro para medir la reflectancia de las muestras. Salvo que se indique de otro modo, las concentraciones de proteínas se calcularon mediante Coomassie Plus (Pierce), siendo BSA el estándar.

[0164] Los siguientes ensayos se utilizaron en los Ejemplos descritos más adelante.

A. Ensayo de Bradford para determinar el contenido proteico en placas de microtitulación (MTP) de 96 pocillos

[0165] En estos ensayos, se utilizó el ensayo de reactivo de tinte de Bradford (Quick Start) para determinar la concentración de proteínas en muestras de proteasa NprE a escala de MTP.

[0166] En este sistema de ensayo, las soluciones químicas y de reactivos utilizadas fueron:

Reactivo de tinte de Bradford Quick Start BIO-RAD, #500-0205

Tampón de dilución 10 mM de NaCl, 0.1 mM de CaCl₂, TWEEN®-80 al 0.005 %

[0167] El equipo usado fue un Biomek FX Robot (Beckman) y un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340); las MTP fueron de Costar (tipo 9017).

[0168] En la prueba, se pipetearon 200 µl de reactivo de tinte de Bradford en cada pocillo, seguidos de 15 µl de tampón de dilución. Por último, se añadieron 10 µl de caldo de cultivo filtrado a los pocillos. Tras una mezcla concienzuda, las MTP se incubaron durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Se soplaron las posibles burbujas de aire y las DO de los pocillos se leyeron a 595 nm.

[0169] Para determinar la concentración de proteínas, se restó la lectura de fondo (es decir, de pocillos no inoculados) de las lecturas de muestra. Los valores de DO₅₉₅ obtenidos proporcionan una medida relativa del contenido proteico de las muestras. La linealidad de las líneas de calibración de NprE entre 0 y 5 µg permitió el uso de valores de DO₅₉₅ nm como medida relativa del contenido proteico. Dado que el contenido esperado de NprE en el sobrenadante fue de 200-300 µg/ml, el volumen de muestra de 10µl usado en la prueba contiene menos de 5 µg de proteínas, lo que proporciona valores en el intervalo lineal.

B. Ensayo de micromuestras para probar el rendimiento de la proteasa

[0170] Los detergentes usados en este ensayo no contenían enzimas. El equipo usado fue un Biomek FX Robot (Beckman) y un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340); las MTP fueron de Costar (tipo 9017).

Preparación del detergente (detergente líquido en agua fría; condiciones de EE. UU.):

[0171] Se ajustó agua Milli-Q a una dureza del agua (Ca/Mg=3/1) de 6 gramos por galón (105 ppm) y se añadieron 0.78 g/l de detergente TIDE® 2007-2x. La solución de detergente se removió enérgicamente durante al menos 15 minutos. A continuación, se añadieron 5mM de HEPES (ácido libre) y el pH se ajustó a 8.2.

Micromuestras

[0172] Se obtuvieron micromuestras de 1/4" (6.3500 mm) de diámetro circular de CFT. Antes de cortar las muestras, la tela (EMPA 116) se lavó con agua. Se colocaron dos micromuestras en cada pocillo de una placa de

microtitulación de 96 pocillos en posición vertical para exponer la totalidad de la superficie (es decir, no se colocaron horizontalmente en el fondo del pocillo).

Método de la prueba

[0173] La incubadora se puso a 20 °C. Las muestras de caldo de cultivo filtradas se sometieron a prueba en una concentración apropiada por medio de la dilución con una mezcla de 10 mM de NaCl, 0.1 mM de CaCl₂ y solución TWEEN®-80 al 0.005 %. La solución de detergente deseada se preparó del modo descrito anteriormente. A continuación, se añadieron 190 µl de solución de detergente a cada pocillo de la MTP que contuviera micromuestras. A esta mezcla se le añadieron 10 µl de la solución enzimática diluida (para proporcionar un volumen total de 200 µl/pocillo). La MTP se cerró con cinta adhesiva y se colocó en la incubadora durante 30 minutos, con una agitación a 1400 rpm. Tras la incubación en las condiciones apropiadas, se retiraron 100 µl de solución de cada pocillo y se colocaron en una nueva MTP. La nueva MTP que contenía 100 µl de solución/pocillo se leyó a 405 nm en un lector de MTP. También se incluyeron ensayos en blanco, así como un control que contenía dos micromuestras y detergente, pero no enzimas.

Cálculo del rendimiento de BMI:

[0174] El valor de absorbancia obtenido se corrigió para el valor en blanco (es decir, el obtenido tras la incubación de micromuestras en ausencia de enzima). La absorbancia resultante fue una medida de la actividad hidrolítica. Para cada muestra (por ejemplo, nprE o variante) se calculó el índice de rendimiento. El índice de rendimiento comparó el rendimiento de la variante (valor real) y el de la enzima estándar (valor teórico) en la misma concentración de proteínas. Además, se calcularon los valores teóricos por medio de los parámetros de la ecuación de Langmuir de la enzima estándar. Un índice de rendimiento (PI) mayor que 1 (PI>1) identificó una mejor variante (en comparación con la estándar [por ejemplo, natural]), mientras que un PI de 1 (PI=1) identificó una variante con el mismo rendimiento que la estándar, y un PI menor que 1 (PI<1) identificó una variante con un peor rendimiento que la estándar. Por tanto, el PI identificó las ganadoras, así como las variantes que son menos deseables para el uso en determinadas circunstancias.

C. Ensayo de estabilidad del citrato para proteasa NprE

[0175] La estabilidad del citrato se midió tras la incubación de NprE natural y variantes en presencia de 50 mM de citrato. La actividad inicial y residual se determinó por medio del ensayo de hidrólisis de DMC. En este sistema de ensayo, las soluciones químicas y de reactivos utilizadas fueron:

Monohidrato de ácido cítrico	Merck 1.00244
Pipes (ácido libre)	Sigma P-1851
Tris (ácido libre)	Sigma T-1378
HEPES (Ultra>99.5 %)	Sigma-H7523
TWEEN®-80	Sigma P-8074
Dimetilcaseína (DMC)	Sigma C-9801
Tampón Tris (ácido libre)	se disolvieron 6.04 g en 1000 ml de agua (= 50 mM)
Tampón HEPES	se disolvieron 11.9 g en 1000 ml de agua (= 50 mM)
Tampón de citrato (ácido libre)	se disolvieron 21.0 g en 1000 ml de agua (= 100 mM),
Tampón PIPES (ácido libre):	se disolvieron 3.32 g en aproximadamente 960 ml de agua,
Solución de DMC	1 % p/v en 55 mM de tampón PIPES, pH final = 6.0
Tampón de dilución 1	0.1 mM de CaCl ₂ /25 mM de Tris; pH 8.2
Tampón de dilución 2	0.1 mM de CaCl ₂ /50 mM de citrato/25 mM de Tris; pH 8.2

[0176] Las concentraciones de estos tampones de dilución se indican en forma de concentraciones finales. La concentración inicial era proporcionalmente mayor y dependía de la tasa de dilución. La concentración inicial era mayor en proporción y dependía de la tasa de dilución. En experimentos alternativos, HEPES se utiliza en lugar

de Tris. El equipo usado fue un Biomek FX Robot (Beckman) y una incubadora/agitador (Innova, tipo 4230; New Brunswick). El pH del tampón PIPES se ajustó a 5.8 con 4 N de HCl (concentración final de 55 mM). El pH del tampón Tris se ajustó a 8.2 con 4 N de HCl (concentración final de 25 mM). El pH del tampón de 50 mM de citrato/25 mM de Tris se ajustó a 8.2 con 4 N de NaOH. El pH del tampón HEPES se ajustó a 8.2 con 4 N de NaOH (concentración final de 25 mM). El pH del tampón de 50 mM de citrato/25 mM de HEPES se ajustó a 8.2 con 4 N de NaOH.

Determinación de proteínas

[0177] Con el objetivo de establecer la tasa de dilución deseada en el ensayo de estabilidad del citrato, se determinó la concentración de proteasa de los controles de NprE natural para cada placa por medio del ensayo de TCA. En este método, se añadieron 25 µl de caldo de cultivo filtrado a 200 µl de TCA al 16.875 % (p/v). Tras incubarse de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, se determinó la dispersión/absorbancia de la luz a 405 nm. La concentración de proteínas se determinó por medio de una línea de calibración construida con NprE purificada.

Método de la prueba

[0178] La tasa de dilución del caldo de cultivo filtrado se determinó por medio del ensayo de TCA, tal y como se describió anteriormente.

Condiciones de tensión:

[0179] El caldo de cultivo filtrado se diluyó con el tampón de dilución 2. La MTP se tapó con cinta adhesiva, se agitó durante unos segundos y se colocó en la incubadora a 25 °C durante 60 minutos a 200 rpm. Tras la incubación, se tomaron 20 µl de la mezcla de cada pocillo y se trasladaron a una nueva MTP que contenía 180 µl de solución de sustrato de DMC al 1 % precalentado (el sustrato se precalentó a 25 °C). La MTP se colocó directamente en la incubadora/agitador y se incubó a 25 °C durante 30 minutos a una agitación de 200 rpm. La actividad residual de proteasa se determinó por medio del ensayo de hidrólisis de dimetilcaseína, que se describe más adelante.

Condiciones sin tensión

[0180] El caldo de cultivo filtrado se diluyó con el tampón de dilución 1. Se tomaron inmediatamente 20 µl de la mezcla de cada pocillo y se trasladaron a una nueva MTP que contenía 180 µl de solución de sustrato de DMC al 1 % precalentado (el sustrato se precalentó a 25 °C). La MTP se colocó directamente en la incubadora/agitador y se incubó a 25 °C durante 30 minutos a una agitación de 200 rpm. La actividad inicial de proteasa se determinó con TNBS por medio del ensayo de hidrólisis de dimetilcaseína, que se describe más adelante.

[0181] Todos los valores de actividad residual (determinados con el ensayo de hidrólisis de dimetilcaseína) se calcularon por medio de la siguiente ecuación.

$$\% \text{ actividad residual} = \text{valor } DO_{60 \text{ min}} * \text{valor } 100 / DO_{00 \text{ min}}$$

D. Ensayo de hidrólisis de dimetilcaseína

[0182] En este sistema de ensayo, las soluciones químicas y de reactivos utilizadas fueron:

Dimetilcaseína (DMC)	Sigma C-9801
TWEEN®-80	Sigma P-8074
Tampón PIPES (ácido libre)	Sigma P-1851; se disolvieron 15.1 g en aproximadamente 960 ml de agua; se ajustó el pH a 6.0 con 4N de NaOH, se añadió 1 ml de TWEEN®-80 al 5 % y el volumen se llevó a 1000 ml. La concentración final de PIPES y TWEEN®-80 fue de 50 mM y 0.005 % respectivamente.
Ácido picrilsulfónico (TNBS)	Sigma P-2297 (solución al 5 % en agua)
Reactivo A	Se disolvieron conjuntamente 45.4 g de Na ₂ B ₄ O ₇ ·10 H ₂ O (Merck 6308) y 15 ml de 4N de NaOH en un volumen final de 1000 ml (mediante calentamiento si es necesario)

Reactivo B

Se disolvieron conjuntamente 35.2 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6346) y 0.6 g de Na_2SO_3 (Merck 6657) en un volumen final de 1000 ml.

Método

[0183] Para preparar el sustrato, se disolvieron 4 g de dimetilcaseína en 400 ml de tampón PIPES. Los sobrenadantes del cultivo filtrado se diluyeron con tampón PIPES. A continuación, se añadieron 10 µl de cada sobrenadante diluido a 200 µl de sustrato en los pocillos de una MTP. La MTP se tapó con cinta adhesiva, se agitó durante unos segundos y se colocó en un horno a 25 °C durante 30 minutos sin agitar. Aproximadamente 15 minutos tras la retirada de la primera placa del horno, el reactivo de TNBS se preparó al mezclar 1 ml de solución de TNBS por 50 ml de Reactivo A. Las MTP se llenaron de 60 µl de TNBS más Reactivo A por pocillo. Las placas incubadas se agitaron durante unos segundos, tras lo cual se trasladaron 10 µl a las MTP con TNBS más Reactivo A. Las placas se taparon con cinta adhesiva y se agitaron durante 20 minutos en un agitador de mesa (BMG ThermoStar) a temperatura ambiente y 500 rpm. Por último, se añadieron 200 µl de Reactivo B a los pocillos, se mezclaron durante 1 minuto en un agitador, y se determinó la absorbancia a 405 nm mediante un lector de MTP.

[0184] El valor de absorbancia obtenido se corrigió para el valor en blanco (es decir, el sustrato sin enzima). La absorbancia resultante constituyó una medida de la actividad hidrolítica. La actividad específica (arbitraria) de una muestra se calculó al dividir la absorbancia entre la concentración de proteínas determinada.

E. Ensayo de estabilidad TIDE®

[0185] La estabilidad de la NprE y variantes se midió tras una etapa de incubación en presencia de detergente TIDE® Compact al 25 %. La actividad inicial y residual se determinó por medio del ensayo AGLA que se describe más adelante. El equipo usado fue un Biomek FX Robot (Beckman), un medidor de fluorescencia (FLUOstar Optima; BMG), una incubadora/agitador (iEMS; Thermoelectron) y una incubadora/agitador (Innova; New Brunswick (tipo 4230)); las MTP fueron de Costar (tipo 9017) y de Greiner (placas negras, tipo 655076).

Sustancias químicas y reactivos:

[0186] En este sistema de ensayo, las soluciones químicas y de reactivos utilizadas fueron:

Detergente TIDE®-compact

Con y sin DTPA

Solución de detergente TIDE®-compact

Se disolvieron 125 g de TIDE®-compact en una mezcla de 50 g de 50 mM de HEPES a un pH 8.2 y 275 ml de agua; la concentración de TIDE® fue de 27.7 %, tras la dilución con sobrenadante de un 25 %

Tampón de dilución MES

52.6 mM de MES/NaOH, 2.6 mM de CaCl_2 , TWEEN®-80 al 0.005 %, pH 6.5

Sustrato AGLA

BaChem, n.º cat. H-6675 o American Peptide Company, n.º cat. 81-0-31

Solución de sustrato AGLA

Se disolvieron 451 mg de AGLA en 16 ml de N,N-dimetilformamida; esta solución se vertió en 304 ml de tampón MES (52.6 mM de MES/NaOH, 2.6 mM de CaCl_2 , TWEEN®-80 al 0.005 %, pH 6.5) con agitación

Método de la prueba:Condiciones sin tensión:

[0187] En primer lugar, se diluyeron 20 µl de caldo de cultivo filtrado con 180 µl de tampón de dilución MES. A continuación, se diluyeron 20 µl de este caldo diluido con 180 µl de tampón de dilución MES. A continuación, se diluyeron 10 µl de esta dilución con 190 µl de solución de sustrato AGLA en una placa precalentada a 25 °C. Se soplaron las burbujas de aire presentes y la placa se midió de acuerdo con el protocolo de ensayo de proteasas AGLA.

Condiciones de tensión:

[0188] En primer lugar, se diluyeron 20 µl de caldo de cultivo filtrado con 180 µl de solución de detergente TIDE®-compact sin DTPA y, tras mezclarse previamente en el agitador iEMS durante 5 minutos, se incubaron además en el agitador Innova. La placa se incubó durante un total de 60 minutos a 32 °C a 200 rpm. Además, se diluyeron 20 µl de caldo de cultivo filtrado con 180 µl de solución de detergente TIDE®-compact con DTPA y, tras mezclarse previamente en el agitador iEMS durante 5 minutos, se incubaron además en el agitador Innova. La placa se incubó durante un total de 40 minutos a 20 °C a 200 rpm. A continuación, se diluyeron 20 µl de cualquiera de estas dos soluciones con 180 µl de tampón de dilución MES y se diluyeron 10 µl de esta dilución con 190 µl de solución de sustrato AGLA en una placa precalentada a 25 °C. Se soplaron las burbujas de aire presentes y la placa se midió de acuerdo con el protocolo de ensayo de proteasas AGLA.

Cálculos:

[0189] Se tomaron las medidas de fluorescencia a una excitación de 350 nm y una emisión de 415 nm. El *software* del espectrofluorímetro calculó las velocidades de reacción del aumento en la fluorescencia para cada pocillo en una línea de regresión lineal de mili-RFU/min:

$$\text{Porcentaje de actividad residual: } \frac{(\text{Pendiente de condición de tensión}) * 100}{(\text{Pendiente de condición sin tensión})}$$

F. Ensayo de proteasas 2-aminobenzoil-L-alanilglicil-L-leucil-L-alanino-4-nitrobencilamida (Abz-AGLA-Nba)

[0190] El método que se proporciona más adelante proporciona un grado de detalle técnico que produce unos datos de ensayo de proteasas reproducibles independientemente del tiempo y el lugar. Aunque el ensayo puede adaptarse a una condición de laboratorio determinada, cualquier dato obtenido a través de un procedimiento modificado debe concordarse con los resultados producidos por el método original. Las metaloproteasas neutras cortan el enlace peptídico entre glicina y leucina de 2-aminobenzoil-L-alanilglicil-L-leucil-L-alanino-4-nitrobencilamida (Abz-AGLA-Nba). La 2-aminobenzoil-L-alanilglicina (Abz-AG) libre en solución presenta un máximo de emisión de fluorescencia a 415 nm, con un máximo de excitación de 340 nm. La fluorescencia de Abz-AG se enfría por nitrobencilamida en la molécula intacta de Abz-AGLA-Nba.

[0191] En estos experimentos, la liberación de Abz-AG por medio del corte de proteasas de Abz-AGLA-Nba se supervisó mediante una espectroscopia de fluorescencia (exc. 340 / em. 415). La tasa de aparición de Abz-AG constituyó una medida de la actividad proteolítica. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones de tasa inicial no limitadas por el sustrato.

[0192] Se necesitó un mezclador de microplaca con control de temperatura (por ejemplo, termomezclador Eppendorf) para reproducir los resultados del ensayo. Las soluciones del ensayo se incubaron a una temperatura deseada (por ejemplo, 25 °C) en el mezclador de microplaca antes de la adición de enzimas. Las soluciones enzimáticas se añadieron a la placa del mezclador, se mezclaron enérgicamente y se trasladaron con rapidez al lector de placas.

[0193] Se necesitó un espectrofluorímetro con la capacidad de registrar datos de manera continua, realizar análisis de regresión lineal y con control de temperatura (por ejemplo, SpectraMax M5, Gemini EM, Molecular Devices). El lector se mantuvo en todo momento a la temperatura deseada (por ejemplo, a 25 °C). El lector se configuró para la detección de fluorescencia de lectura por arriba y la excitación se estableció a 350 nm y la emisión a 415 nm sin el uso de un filtro de corte. El tubo fotomultiplicador se configuró a sensibilidad media y a 5 lecturas por pocillo. Se activó la calibración automática, pero únicamente para calibrar antes de la primera lectura. El ensayo se midió durante 3 minutos, minimizando el intervalo de lectura de acuerdo con el número de pocillos seleccionados para ser supervisados. El lector se configuró para calcular la tasa de mili-RFU/min (milésimas de unidades relativas de fluorescencia por minuto). El número de lecturas usadas para calcular la tasa (puntos de Vmax) se configuró para que fuera el número equivalente a 2 minutos, determinado por el intervalo de lectura (por ejemplo, una lectura cada 10 segundos usaría 12 puntos para calcular la tasa). La RFU máxima se configuró para que fuera 50 000.

[0194] Todo pipeteado de soluciones madre enzimáticas y de sustratos se realizó con pipetas de desplazamiento positivo (Rainin Microman). Las soluciones de trabajo de tampón, de ensayo y enzimáticas se pipetearon por medio de pipetas de desplazamiento de aire sencillas o multicanal (Rainin LTS) desde tubos, depósitos de reactivos o microplacas de reserva. Una pipeta de repetición (Eppendorf) se utiliza en el traslado de la solución de ensayo a los pocillos de la microplaca cuando se usan pocos pocillos, para minimizar la pérdida de reactivo. Los instrumentos de pipeteado automático, como el Beckman FX o el pocillo Cybio Cybi, también se utilizan en el

traslado de soluciones enzimáticas de una microplaca de reserva de trabajo a la microplaca de ensayo para iniciar de una sola vez toda una microplaca.

Reactivos y soluciones

Tampón MES – 52.6 mM de MES/NaOH, 2.6 mM de CaCl₂, pH 6.5

[0195] Se disolvieron ácido MES (10.28 g) y 292 mg de CaCl₂ anhidro en aproximadamente 900 mL de agua purificada. La solución se sometió a titulación con NaOH a un pH de 6.5 (a 25 °C o con una sonda de pH de ajuste de temperatura). El tampón con pH ajustado se constituyó hasta 1 L de volumen total. La solución final se filtró por un filtro estéril de 0.22 µm y se mantuvo a temperatura ambiente.

Solución madre de Abz-AGLA-Nba – 48 mM de Abz-AGLA-Nba en DMF

[0196] Se colocaron aproximadamente 28 mg de Abz-AGLA-Nba en un tubo pequeño. Se disolvió en 1 mL de DMF (el volumen variará en función de la Abz-AGLA-Nba concentrada) y se sometió a agitación vorticial durante varios minutos. La solución se almacenó a temperatura ambiente resguardada de la luz.

Solución del ensayo – 50 mM de MES, 2.5 mM de CaCl₂, DMF al 5 %, 2.4 mM de Abz-AGLA-Nba pH 6.5

[0197] Se añadió un mL de la solución madre de Abz-AGLA-Nba a 19 mL de tampón MES y se sometió a agitación vorticial. La solución se almacenó a temperatura ambiente resguardada de la luz.

Tampón de dilución enzimática – 50 mM de MES, 2.5 mM de CaCl₂, pH 6.5

[0198] Este tampón se produjo al añadir 5 mL de agua purificada a 95 mL de tampón MES.

Tampón de dilución del sustrato – 50 mM de MES, 2.5 mM de CaCl₂, DMF al 5 %, pH 6.5

[0199] Se añadieron cinco mL de DMF puro a 95 mL de tampón MES. Este tampón se utilizó para la determinación de parámetros cinéticos.

Soluciones enzimáticas

[0200] Las soluciones madre enzimáticas se diluyeron con tampón de dilución enzimática a una concentración de aproximadamente 1 ppm (1 µg/mL). La proteasa neutra MULTIFECT® (NprE natural) se diluyó a concentraciones por debajo de 6 ppm (6 µg/mL). Se prefirieron diluciones en serie. Las soluciones fueron estables a temperatura ambiente durante 1 hora, pero para un almacenamiento a más largo plazo, las soluciones se mantuvieron sobre hielo.

Procedimiento

[0201] En primer lugar, se prepararon todos los tampones, soluciones madre y soluciones de trabajo. Salvo que se indique de otro modo, cada dilución enzimática se sometió a ensayo por triplicado. Cuando no está llena del todo, la microplaca de reserva de solución de trabajo enzimática se dispuso en columnas verticales completas empezando desde la izquierda de la placa (para acomodar el lector de placas). La placa de ensayo correspondiente se ajustó de manera similar. El espectrofluorímetro de microplaca se ajustó del modo descrito anteriormente.

[0202] En primer lugar, se colocaron alícuotas de 200 µL de solución de ensayo en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. La placa se incubó durante 10 min a 25 °C en un mezclador de microplaca de temperatura controlada, resguardada de la luz. El ensayo se inició al trasladar 10 µL de las soluciones enzimáticas de trabajo de la microplaca de reserva a la microplaca de ensayo en el mezclador. Óptimamente, se utiliza una cabeza de pipeteo de 96 pocillos o se utilizó una pipeta multicanal de 8 pocillos para el traslado desde la primera columna que estaba más a la izquierda. Las soluciones se mezclaron enérgicamente durante 15 segundos (900 rpm en un termomezclador Eppendorf). La microplaca de ensayo se trasladó de inmediato al espectrofluorímetro de microplaca y comenzó el registro de las medidas de fluorescencia a una excitación de 350 nm y una emisión de 415 nm. El *software* del espectrofluorímetro calculó las velocidades de reacción del aumento en la fluorescencia para cada pocillo en una línea de regresión lineal de mili-RFU/min. En algunos experimentos, se colocó una segunda placa en el mezclador de microplaca para equilibrar la temperatura al tiempo que se leía la primera placa.

[0203] Las velocidades iniciales fueron lineales con respecto a la concentración de producto (es decir, fluorescencia de 2-aminobenzoil liberada) hasta 0.3 mM de producto, que correspondía a aproximadamente

50 000 RFU en una solución que se inicia en 2.3 mM de Abz-AGLA-Nba con una fluorescencia de fondo de aproximadamente 22 000 RFU. Abz-AGLA-Nba se disolvió en DMF y se utilizó el día en que se preparó.

COMPOSICIONES DETERGENTES:

[0204] En las composiciones detergentes de ejemplo, los niveles enzimáticos se expresan por enzima pura en peso de la composición total y, salvo que se especifique de otro modo, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales. Las identificaciones de componentes abreviadas en la presente memoria tienen los siguientes significados:

Abreviatura	Ingrediente
LAS	: alquilbenceno sulfonato de sodio C ₁₁₋₁₃ lineal.
NaC16-17HSAS	: alquilsulfato de sodio C ₁₆₋₁₇ de alta solubilidad.
TAS	: alquilsulfato de sodio de sebo.
CxyAS	: alquilsulfato de sodio C _{1x} - C _{1y} .
CxyEz	: alcohol primario C _{1x} - C _{1y} predominantemente lineal condensado con una media de z moles de óxido de etileno.
CxyAEzS	: alquilsulfato de sodio C _{1x} - C _{1y} condensado con una media de z moles de óxido de etileno. Nombre de molécula añadido en los ejemplos.
No iónico	: alcohol graso etoxilado/propoxilado mixto, por ejemplo, Plurafac LF404, siendo un alcohol con un grado medio de etoxilación de 3.8 y un grado medio de propoxilación de 4.5.
QAS	: R ₂ .N+(CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH) con R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄ .
Silicato	: silicato de sodio amorfo (relación SiO ₂ :Na ₂ O = 1.6-3.2:1).
Metasilicato	: metasilicato de sodio (relación SiO ₂ :Na ₂ O = 1.0).
Zeolita A	: aluminosilicato hidratado de fórmula Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ . 27H ₂ O
SKS-6	: silicato laminar cristalino de fórmula δ-Na ₂ Si ₂ O ₅ .
Sulfato	: sulfato sódico anhidro.
STPP	: tripolifosfato de sodio.
MA/AA	: copolímero aleatorio de acrilato/maleato 4:1, peso molecular medio de aproximadamente 70 000-80 000.
AA	: polímero de poliácrito de sodio de peso molecular medio de 4500.
Policarboxilato	: copolímero que comprende una mezcla de monómeros carboxilados como acrilato, maleato y metacrilato con un PM que oscila entre 2000-80 000 como Sokolan, comercializado por BASF, siendo un copolímero de ácido acrílico de PM 4500.
BB1	: propano sulfonato de 3-(3,4-dihidroisoquinolinio)
BB2	: decano-2-sulfato de 1-(3,4-dihidroisoquinolinio)
PB 1	: perborato de sodio monohidratado.
PB4	: perborato de sodio tetrahidratado de fórmula nominal NaBO ₃ .4H ₂ O.
Percarbonato	: percarbonato de sodio de fórmula nominal 2Na ₂ CO ₃ .3H ₂ O ₂ .
TAED	: tetraacetiletildiamina.
NOBS	: sulfonato de nonanoiloxibenceno en forma de sal sódica.
DTPA	: ácido dietilentriaminopentaacético.
HEDP	: ácido 1,1-hidroxietanodifosfónico.
DETPMP	: penta(metilen)fosfonato de dietiltriaina (metileno), comercializado por Monsanto con el nombre comercial Dequest 2060.
EDDS	: ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) en forma de su sal sódica.
Diamina	: dimetilaminopropilamina; 1,6-hexanodiamina; 1,3-propanodiamina; 2-metil-1,5-pentanodiamina; 1,3-pentanodiamina; 1-metildiaminopropano.
DETBCHD	: dicloruro de 5, 12- dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo [6,6,2] hexadecano, sal de Mn(II)
PAAC	: acetato de pentaamina sal de cobalto(III).
Parafina	: aceite de parafina vendido con el nombre comercial Winog 70 por Wintershall.
Sulfonato de parafina	: aceite o cera de parafina donde algunos de los átomos de hidrógeno se han reemplazado por grupos sulfonato.
Aldosa oxidasa	: enzima oxidasa vendida con el nombre comercial Aldose Oxidase por Novozymes A/S.
Galactosa oxidasa	: galactosa oxidasa de Sigma.
nprE	: la forma recombinante de la metaloproteasa neutra expresada en <i>Bacillus subtilis</i> .
PMN	: metaloproteasa neutra purificada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .

Abreviatura	Ingrediente
Amilasa	: enzima amilolítica vendida con el nombre comercial PURAFECT® Ox descrita en los documentos WO 94/18314, WO96/05295 y vendida por Genencor; NATALASE®, TERMAMYL®, FUNGAMYI® y DURAMYL™, todas disponibles de Novozymes A/S.
Lipasa	: enzima lipolítica vendida con el nombre comercial LIPOLASE®, LIPOLASE® Ultra de Novozymes A/S y Lipomax™ de Gist-Brocades.
Celulasa	: enzima celulítica vendida con el nombre comercial Carezyme, Celluzyme y/o Endolase de Novozymes A/S.
Pectina liasa	: PECTAWAY® y PECTAWASH®, disponibles de Novozymes A/S.
PVP	: polivinilpirrolidona con un peso molecular medio de 60 000.
PVNO	: N-óxido de polivinilpiridina, con un peso molecular medio de 50 000.
PVPVI	: copolímero de vinilimidazol y vinilpirrolidona, con un peso molecular medio de 20 000.
Blanqueador 1	: 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenilo de disodio.
Antiespumante de silicona	: regulador de la espuma de polidimetilsiloxano con un copolímero de siloxano-oxialquileo como dispersante, con una relación de dicho regulador de espuma con respecto a dicho dispersante de 10:1 a 100:1.
Supresor de jabonaduras	: 12 % de silicona/sílice, 18 % de alcohol estearílico, 70 % de almidón en forma granulada.
SRP 1	: poliésteres de extremo terminado aniómicamente.
PEG X	: polietilenglicol, de peso molecular x.
PVP K60®	: homopolímero de vinilpirrolidona (PM medio 160 000)
Jeffamine® ED-2001	: polietilenglicol con terminación de Huntsman
Isachem® AS	: sulfato de alquilo de alcohol ramificado de Enichem
MME PEG (2000)	: monometiléterpolietilenglicol (PM 2000) de Fluka Chemie AG.
DC3225C	: supresor de jabonaduras de silicona, mezcla de aceite de silicona y sílice de Dow Corning.
TEPAE	: etoxilato de tetraetilenpentaamina.
BTA	: benzotriazol.
Betaina	: $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
Azúcar	: D-glucosa de calidad industrial o azúcar de calidad alimentaria
CFAA	: alquilo C ₁₂ -C ₁₄ -N-metilglucamida
TPKFA	: ácidos grasos de fracción completa descabezada C ₁₂ -C ₁₄ .
Arcilla	: silicato de aluminio hidratado de fórmula general $\text{Al}_2\text{O}_3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Tipos: caolín, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita.
pH	: medido en solución al 1 % en agua destilada a 20 °C.

EJEMPLO 1

5 Clonación del gen de metaloproteasa neutra a partir de *B. amyloliquefaciens*.

[0205] En este Ejemplo, se describen los métodos usados para clonar el gen de metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens*. La metaloproteasa neutra codificada por gen se clonó a partir de *B. amyloliquefaciens* por medio de métodos bien establecidos en la técnica. La cepa BC91504 (*aprE/nprE*-pJM102 en BG3594::comK) no exenta (es decir, la cepa lleva ADN extragenérico (además del marcador seleccionable de cloranfenicol que se permite en una cepa exenta), específicamente las secuencias plásmido pJM102) lleva el promotor y la secuencia señal de *aprE* de *B. subtilis* fusionados al propéptido/gen maduro de *nprE* de *B. amyloliquefaciens* en el plásmido de integración pJM102.

[0206] Las dos secuencias siguientes (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2) de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* se generaron mediante PCR, correspondiendo los cebadores de oligonucleótidos a las secuencias subrayadas.

[0207] El sitio de restricción (GAATTC) de *EcoRI* cromosómico de *B. subtilis* y el codón de iniciación (GTG) de *aprE* y el codón de terminación de *nprE* de *B. amyloliquefaciens* se muestran en las secuencias siguientes en negrita, así como un sitio de restricción (AAGCTT) de *HindIII* introducido sintéticamente y diseñado en el cebador n.º 4.

[0208] La secuencia arriba, promotor y región de codificación de la secuencia señal 5' de *aprE* de *B. amyloliquefaciens* se muestran en la siguiente secuencia (SEQ ID NO:1). El cebador 1 (*apr*-f; GAGCTGGGTAAAGCCTATGAAT; SEQ ID NO:5) se muestra subrayado, al comienzo de la secuencia, mientras que la parte *aprE* de los cebadores 2 y 3 (*npr*-f y *npr*-r; GTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCT; SEQ ID NO:6) se muestra con doble subrayado al final de la secuencia.

GAGCTGGGTAAAGCCTATGAATTCTCCATTTTCTTCTGCTATCAAAATAACAGAC
TCGTGATTTTCCAAACGAGCTTTCAAAAAAGCCTCTGCCCCTTGCAAATCGGATG
CCTGTCTATAAAATTCCCGATATTGGTTAAACAGCGGCGCAATGGCGGCCGCATC
TGATGTCTTTGCTTGGCGAATGTTTCATCTTATTTCTTCTCCTCCCTCTCAATAATTTT
TCATTCTATCCCTTTTCTGTAAAGTTTATTTTTTCAGAATACTTTTATCATCATGCTT
TGAAAAAATATCACGATAATATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACGCAGGTCATT
TGAACGAATTTTTTCGACAGGAATTTGCCGGGACTCAGGAGCATTTAACCTAAAA
AAGCATGACATTTACGCATAATGAACATTTACTCATGTCTATTTTCGTTCTTTTCT
GTATGAAAATAGTTATTTTCGAGTCTCTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACCTA
AATAGAGATAAAATCATCTCAAAAAAATGGGTCTACTAAAATATTATTCCATCTA
TTACAATAAATTCACAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTAA
AGGAGAGGGTAAAGAGTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGCTTGTTGTTTGCG
TTAACGTTAATCTTTACGATGGCGTTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCT (SEQ ID
NO:1)

5

[0209] La secuencia del propéptido de *B. amyloliquefaciens* y la secuencia madura de codificación de *nprE* y el terminador de transcripción se proporcionan en la siguiente secuencia. En esta secuencia, la parte de *nprE* de los cebadores 2 y 3 está subrayada (GCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTG; SEQ ID NO:7), mientras que la parte de *npr-r* del cebador 4 (GGCTTCACCATGATCATATATGTCAAGCTTGGGGGG; SEQ ID NO:8) se muestra con doble subrayado.

10

GCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTGACGAATTTGTACCGAAGCATTCTT
TGGTGCAATCAGAATTGCCTTCTGTCAAGTACAAAGCTATCAAGCAATACTTGAA
ACAAAACGGCAAAGTCTTTAAAGGCAATCCTTCTGAAAGATTGAAGCTGATTGAC
CAAACGACCGATGATCTCGGCTACAAGCACTCCGTTATGTGCCTGTCTGTAACG
GTGTGCCTGTGAAAGACTCTCAAGTCATTATTCACGTCGATAAATCCAACAACGT
CTATGCGATTAAACGGTGAATTAAACAACGATGTTTCCGCCAAAACGGCAAACAGC
AAAAAATTATCTGCAAATCAGGCGCTGGATCATGCTTATAAAGCGATCGGCAAAT
CACCTGAAGCCGTTTCTAACGGAACCGTTGCAAACAAAAACAAAGCCGAGCTGA
AAGCAGCAGCCACAAAAGACGGCAAATACCGCCTCGCCTATGATGTAACCATCC
GCTACATCGAACCGGAACCTGCAAACCTGGGAAGTAACCGTTGATGCGGAAACAG
GAAAAATCCTGAAAAAGCAAAACAAAGTGGAGCATGCCGCCACAACCGGAACAG
GTACGACTCTTAAAGGAAAAACGGTCTCATTAAATATTTCTTCTGAAAGCGGCAA
ATATGTGCTGCGCGATCTTTCTAACCTACCGGAACACAAATTATTACGTACGAT
CTGCAAAACCGCGAGTATAACCTGCCGGGCACACTCGTATCCAGCACCACAAACC
AGTTTACAACCTTCTTCTCAGCGCGCTGCCGTTGATGCGCATTACAACCTCGGCAAA
GTGTATGATTATTTCTATCAGAAGTTTAATCGCAACAGCTACGACAATAAAGGCG
GCAAGATCGTATCCTCCGTTTATTACGGCAGCAGATACAATAACGCAGCCTGGAT
CGGCGACCAAATGATTTACGGTGACGGCGACGGTTTATTCTTCTCACCTCTTTCCG

GTTCAATGGACGTAACCGCTCATGAAATGACACATGGCGTTACACAGGAAACAG
 CCAACCTGAACTACGAAAATCAGCCGGGCGCTTTAAACGAATCCTTCTCTGATGT
 ATTCGGGTACTTCAACGATACTGAGGACTGGGATATCGGTGAAGATATTACGGTC
 AGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCTTATCCAATCCGACAAAATACGGACAGCCTGATA
 ATTTCAAAAATTACAAAAACCTTCCGAACACTGATGCCGGCGACTACGGCGGGCGT
 GCATACAAACAGCGGAATCCCGAACAAAGCCGCTTACAATACGATTACAAAAAT
 CGGCGTGAACAAAGCGGAGCAGATTTACTATCGTGCTCTGACGGTATACCTCACT
 CCGTCATCAACTTTTAAAGATGCAAAAGCCGCTTTGATTCAATCTGCGCGGGGACC
 TTTACGGCTCTCAAGATGCTGCAAGCGTAGAAGCTGCCTGGAATGCAGTCGGATT
 GTAAACAAGAAAAGAGACCGGAAATCCGGTCTCTTTTTTATATCTAAAAACATTT
 CACAGTGGCTTCACCATGATCATATATGTCAAGCTTGGGGGG (SEQ ID NO:2)

[0210] La secuencia de aminoácidos del NprE de longitud completa (secuencia pre, pro y madura) se proporciona a continuación:

5

MGLGKKLSVAVAASFMSLTISLPGVQAAENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPSVSDK
 AIKQYLKQNGKVKGNPSERLKLIDQTTDDLGYKHFRYPVVNGVPVKDSQVIIHVDK
 SNNVYAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKNKA
 ELKAAATKDGYRLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVD AETGKILKKQNKVEHAATTGT
 GTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGLTVSSTTNQFTT
 SSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRNSYDNKGGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQ
 MIYGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYF
 NDTEDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGQPDNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGI
 PNKAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTSPSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAASV
 EAAWNAVGL (SEQ ID NO:3)

[0211] En algunas formas de realización alternativas, la siguiente secuencia de NprE se utiliza en la presente invención.

10

VRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNMSAQAAENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPSVSD
 KAIKQYLKQNGKVKGNPSERLKLIDQTTDDLGYKHFRYPVVNGVPVKDSQVIIHV
 DKSNNVYAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKN
 KAELKAAATKDGYRLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVD AETGKILKKQNKVEHAATT
 GTGTTKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGLTVSSTTNQF
 TTSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRNSYDNKGGKIVSSVHYGSRYNNAAWIG
 DQMIYGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFG
 YFNDTEDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGQPDNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNS
 GIPNKAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTSPSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAA
 SVEAAWNAVGL (SEQ ID NO:4)

15 [0212] Las secuencias de cebador usadas en estos experimentos de PCR se proporcionan a continuación:

Cebadores usados en experimentos de PCR		
Número de cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
1	5'-GAGCTGGGTAAAGCCTATGAAT-3'	SEQ ID NO:5
2	5'-CAGGTTTTCTTTAAGCTGAGGATTCTCAGC-AGCCTGCGCAGACATGTTGCTGAAC-3'	SEQ ID NO:9
3	5'-GTTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCT-GCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTG-3'	SEQ ID NO:10
4	5'-CCCCCAAGCTTGACATATATGATCATGGTGAAGCC-3'	SEQ ID NO:11

[0213] Los cebadores 2 y 3 son complementos inversos el uno del otro y se corresponden a hebras no codificantes (n.º 2) o codificantes (n.º 3) de los ADN cromosómicos. Para la hebra codificante, se corresponden a los 25 últimos pares de bases de la secuencia señal de *aprE* y los primeros 30 pares de bases del propéptido de *nprE*. El cebador n.º 4 es el complemento inverso de la secuencia subrayada, que comprende 24 pares de bases 3' del codón de terminación de *nprE* y el terminador con un sitio de *HindIII* introducido precedido por seis residuos de dCTP, para proporcionar una llamada «grapa» que permite un corte más eficaz con la endonucleasa de restricción *HindIII*, puesto que algunas enzimas de restricción escinden de forma poco eficaz si su secuencia de reconocimiento se localiza en los extremos de los fragmentos de ADN.

[0214] Los dos fragmentos de PCR se generaron con el siguiente protocolo y reactivos (salvo el molde de ADN y los cebadores de oligonucleótidos) del kit ADN polimerasa rTTH, XL de Applied Biosystems:

40.6 µl de H₂O

30 µl de tampón 3.3x de PCR de *rTth*

10 µl de 2 mM de mezcla de dNTP

4.4 µl de 25 mM de Mg-acetato

5 µl de 50 µM de cebador n.º 1 o n.º 3 (cebadores directos)

5 µl de 50 µM de cebador n.º 2 o n.º 4 (cebadores inversos)

2 µl de ADN cromosómico de *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens*

2 µl de polimerasa *rTth*

1 µl de polimerasa *Pfu Turbo*

100 µl volumen total de reacción

[0215] Las condiciones de PCR usadas en estos experimentos fueron (95 °C, 30 s/58 °C, 30 s/68 °C, 1 min) x 30 ciclos seguido de un rápido enfriamiento a 4 °C. Las reacciones se llevaron a cabo sobre geles de preparación de agarosa/TBE al 1.2 %, siendo los fragmentos de tamaño apropiado escindidos y purificados por medio del kit de extracción de gel QIAGEN®. En una segunda fusión, se llevaron a cabo reacciones por PCR en las que los ADN cromosómicos se reemplazaron por 1 µl de cada uno de los dos fragmentos separados y únicamente se usaron los cebadores externos n.º 1 y n.º 2. Se usaron las mismas condiciones de PCR descritas anteriormente. Debido a que se formaron extremos complementarios en los dos fragmentos derivados del uso de los cebadores complementarios 2 y 3 en las primeras PCR, los dos fragmentos se fusionaron con precisión.

[0216] El fragmento de fusión se digirió con *EcoRI* y *HindIII* y el gel se purificó tal y como se describió anteriormente. El plásmido de integración pJM102 también se digirió con *EcoRI* y *HindIII* y, a continuación, el plásmido lineal se purificó con gel y se ligó por medio de técnicas estándar al fragmento de fusión *apr/npr* digerido. Esta reacción de ligamiento se utilizó posteriormente para transformar directamente una cepa de *B. subtilis* inducida por xilosa.

[0217] Tras la purificación, los dos fragmentos se generaron por PCR con los cebadores 1 y 2 del ADN cromosómico de *B. subtilis* natural y con los cebadores 3 y 4 del ADN cromosómico de una cepa de *B. amyloliquefaciens*. Este fragmento se purificó de nuevo del modo descrito anteriormente, seguido de la ruptura con *EcoRI* and *HindIII* al igual que en la digestión del plásmido de integración pJM102 y el posterior ligamiento del fragmento de fusión con el plásmido. La secuencia de fusión de varios transformantes se realizó a partir del

cromosoma para verificar la ausencia de mutaciones derivadas de la PCR. A continuación uno de estos se amplificó de manera gradual a partir de 5 - 25 mg/mL de cloranfenicol, el marcador seleccionable sobre pJM102, para coamplificar el casete de expresión enlazado.

5 **[0218]** El transformante verificado de la secuencia seleccionada se obtuvo por medio de la selección para el marcador de resistencia de cloranfenicol (CMP) de pJM102 en placas de LB/agar que contenían 5 mg/ml de CMP. A continuación, se inoculó en caldo de LB a 10 mg/ml de CMP toda la noche a 37 °C, con una agitación de 250 RPM. Después, este cultivo se sembró en estrías en placas de LB/agar con 10 mg/ml de CMP para aislar colonias individuales. A continuación, se inoculó una colonia en caldo de LB a 25 mg/ml de CMP toda la noche a 10 37 °C, con una agitación de 250 RPM. Después, este cultivo se sembró en estrías en placas de LB/agar con 25 mg/ml de CMP para aislar colonias individuales. Estas colonias se recolectaron y almacenaron en glicerol a - 70 °C hasta su uso, como se conoce en la técnica.

15 **[0219]** La delección de las dos proteasas no esenciales presentes en *B. subtilis* (aprE y nprE), así como de amilasa, redujo el nivel total de proteasa extracelular durante la producción de metaloproteasa. El ADN que codificaba la metaloproteasa neutra se clonó en un hospedador de delección de amilasa. El comK inducible para el desarrollo de la competencia se insertó en el medio del locus de amilasa, con lo que la cepa es «ami». La secreción de la proteína expresada se garantizó al insertar los nucleótidos que codificaban la secuencia señal antes de la secuencia de codificación del gen.

20 EJEMPLO 2

Expresión y fermentación de MULTIFECT® Neutral purificada y de la metaloproteasa neutra (nprE) recombinante

25 **[0220]** La bacteria *Bacillus subtilis* recombinante producida del modo descrito en el Ejemplo 1 se cultivó por medio de una fermentación discontinua convencional en un medio nutritivo como se describe a continuación. Se usó un vial de glicerol (preparado del modo descrito en el Ejemplo 1) de un cultivo de *B. subtilis* que contenía la metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens* para inocular 600 ml de medio SBG al 1 % que contenía 200 30 mg/L de cloranfenicol. Los cultivos se dejaron cultivar durante 48 horas a 37 °C, tras lo que el fluido de cultivo se recuperó mediante centrifugación a 12 000 rpm, como se conoce en la técnica. Este procedimiento se realizó por duplicado. Las concentraciones enzimáticas totales que se obtuvieron se encontraban en el intervalo de aproximadamente 1.4 y 2 g/L.

35 EJEMPLO 3

Purificación y caracterización de la metaloproteasa neutra

40 **[0221]** Este Ejemplo describe los métodos usados para purificar la metaloproteasa neutra expresada por los organismos descritos en el Ejemplo 2. Tras 36 horas de incubación a 37 °C, el caldo de fermentación de recuperó y se centrifugó a 12 000 rpm (centrifugadora SORVALL® modelo RC5B). Las metaloproteasas neutras secretadas se aislaron del fluido de cultivo y se concentraron aproximadamente 10 veces por medio de un sistema de filtrado Amicon 8400 con un punto de corte de 10 kDa de BES (polietersulfona).

45 **[0222]** El sobrenadante concentrado se sometió a diálisis toda la noche a 4 °C frente a 25 mM de tampón MES, pH 5.4, que contenía 10 mM de NaCl. A continuación, el dialisato se cargó en una columna de intercambio de cationes Porous HS20 (volumen total ~ 83 mL; capacidad de unión ~ 4.5 g proteína/mL columna; Waters) como se describe a continuación. La columna se equilibró previamente con 25 mM de tampón MES, pH 5.4, que contenía 10 mM de NaCl. A continuación, se cargaron aproximadamente 200-300 mL de muestra en la columna. 50 La proteína unida se eluyó por medio de un gradiente de pH de 5.4 a 6.2 sobre 10 volúmenes de columna de tampón MES. La elución de la proteína fue entre un pH de 5.82 y de 6.0, y se evaluó por medio de la actividad proteolítica descrita en la presente memoria y de NUPAGE® SDS-PAGE (Novex) al 10 % (p/v). La proteasa neutra que contenía fracciones se acumuló entonces. Se añadieron sales de calcio y cloruro de cinc en la proporción de 3:1 antes del ajuste del pH a 5.8. Se usó Perceptive Biosystems BIOCAD® Vision (GMI) para 55 purificar la proteína.

[0223] La proteína purificada, que se evaluó por medio de NUPAGE® SDS-PAGE al 10 % (p/v), se determinó que era homogénea, con una pureza superior al 95 %. Normalmente, menos del 1 % de las preparaciones purificadas mostraron una actividad de proteasa serínica cuando se las evaluó por medio del ensayo de proteasas estándar con el sustrato pequeño, suc-p-AAPF-pNA (N-succinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Fe-p-nitroanilida) (Sigma). Este ensayo se llevó a cabo en formato de placas de microtitulación (96 pocillos) mediante un tampón de 100 mM de Tris-HCl, pH 8.5, que contenía 10 mM de CaCl₂ y TWEEN®-80 al 0.005 %. El sustrato (p-AAPF NA) se preparó al elaborar una solución madre de 160 mM en DMSO (dimetilsulfóxido) (100 mg/ml) y diluir esta solución madre 100 veces con el tampón de Tris-HCl que contenía CaCl₂ y TWEEN®-80 al 0.005 %. A

continuación, se añadieron 10 uL de solución de proteasa diluida (las diluciones se prepararon por medio de 100 mM de tampón de Tris-HCl, pH 8.5, que contenía 10 mM de CaCl_2 y TWEEN-80 al 0.005 %) a 190 uL de una solución de p-AAPF de 1mg/ml. El ensayo se mezcló durante 5 minutos y el cambio cinético a 410 nm se leyó de 2 a 5 minutos. Se midió la pendiente de la respuesta y se usó de indicadora de la cantidad de actividad de proteasa serínica. La proteína se formuló para su almacenamiento por medio de 25 mM de tampón MES, pH 5.8, que contenía 1 mM de cloruro de cinc, 4 mM de cloruro cálcico y propilenglicol al 40 %.

EJEMPLO 4

Afinidad de la metaloproteasa neutra (PMN) MULTIFECT® purificada por cationes de calcio y de cinc

[0224] En este Ejemplo, se describen los métodos para determinar la afinidad de la metaloproteasa neutra (PMN) preparada según se ha descrito en los Ejemplos anteriores. Se llevaron a cabo las afinidades de la PMN por iones de calcio y de cinc por medio de los indicadores fluorescentes Fluo-3 y FluoZin-3, obtenidos respectivamente de Molecular Probes. Todas las medidas de fluorescencia se registraron en un espectrofotómetro de luminiscencia LS50B (Perkin-Elmer). Se supervisó la unión de Fluo-3 por medio de una excitación a 500 nm y los espectros de emisión se registraron de 505 a 550 nm. De manera similar, se supervisó la unión de FluoZin-3 por medio de una excitación a 495 nm y los espectros de emisión se recopilaron de 500 a 550 nm. El ancho de ranura tanto de la excitación como de la emisión se estableció en 2.5 nm.

[0225] En estas determinaciones, 100 uM de metaloproteasa neutra en 50 mM de tampón Tris-HCl, pH 8.4, se sometieron a titulación, con unas cantidades cada vez mayores del indicador relevante. Las curvas de titulación se muestran en la Figura 1. En esta Figura, los triángulos representan los datos de unión de la curva obtenidos para Zn^{2+} , por medio del tinte Fluo-Zin3 supervisado a 516 nm, mientras que los círculos representan los datos obtenidos para Ca^{2+} por medio del tinte Fluo-3 supervisado a 522 nm. Las constantes de asociación (K_a) para el cinc y el calcio (asumiendo que hay un solo sitio de unión) se determinaron que eran 0.401 nM y 0.037 nM, respectivamente. Estos resultados indican que la metaloproteasa neutra MULTIFECT® purificada se unió al ión de cinc con una afinidad aproximadamente 10 veces mayor que la del ión de calcio. En función de la unión más débil del calcio, los experimentos iniciales de ingeniería de proteínas están pensados para que o bien (i) se diseñe un sitio o sitios de unión a calcio más fuertes y/o (ii) se elimine la exigencia de estabilidad estructural para el calcio (por ejemplo, estabilizar la proteína a más de un 80 %).

EJEMPLO 5

Estabilidad en el almacenamiento

[0226] En este Ejemplo, se describen los experimentos realizados para evaluar la estabilidad en el almacenamiento de PMN y de la metaloproteasa neutra recombinante de *B. amyloliquefaciens* expresada en *B. subtilis*. La proteólisis de dichas preparaciones de metaloproteasa neutra se evaluó en presencia de soluciones cada vez mayores (de 0 % hasta 10 % inclusive) de LAS (sulfato sódico de laurilo; Sigma). Los fragmentos proteolíticos generados a partir de la metaloproteasa neutra MULTIFECT® purificada (PMN) se observaron por medio de de NUPAGE® SDS-PAGE al 10 % (p/v).

[0227] La estabilidad en el almacenamiento de la metaloproteasa neutra recombinante de *B. amyloliquefaciens* expresada en *B. subtilis* y producida del modo descrito anteriormente se determinó con el tampón solamente (50 mM de tampón Tris-HCl, pH 8.4) y en presencia de base de detergente obtenida de Procter & Gamble. El tampón y/o base de detergente contenía iones de cinc, iones de calcio o una combinación de estos. La concentración tanto de los iones de cinc como de calcio se varió de 0 a 25 mM. Estos resultados se compararon en todo momento con los de la metaloproteasa neutra incubada solamente en el tampón.

Ensayos de proteasas

Ensayo de azocaseína:

[0228] El ensayo de punto final de azocaseína se utilizó para evaluar la cantidad de proteólisis que se produjo en determinadas condiciones. En dichos ensayos, se incubaron 75 uL de enzima con un exceso de iones de calcio o cinc o de ambos añadidos a 250 uL de azocaseína (Sigma) al 1 % (p/v). La reacción continuó a 30 °C durante 15 minutos, tras lo cual se añadió ácido tricloroacético al 10 % (p/v) para detener la reacción. La proteína precipitada y la azocaseína no reaccionada se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos a 14 000 rpm. El color del grupo azo se desarrolló por adición de 750 uL de 1 M de hidróxido sódico. El desarrollo del color continuó durante 5 minutos, tras lo cual la reacción se detuvo y se midió la absorbancia a 440 nm.

Ensayo de caseína succinilada y TNBSA:

[0229] La actividad de la metaloproteasa neutra se determinó por medio del QuantiCleave Protease Assay Kit™ (Pierce). Este ensayo se basa en la digestión de caseína succinilada por la enzima. Los grupos amino primarios formados se reaccionan entonces con ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBSA) y forman un complejo coloreado que presenta una absorbancia máxima a 450 nm. El ensayo se lleva a cabo en formato de microtitulación de 96 pocillos. El ensayo necesita una incubación de 15 minutos con la caseína succinilada y una reacción de 15 minutos con el TNBSA. En el transcurso de ambas incubaciones, las muestras se colocan sobre un agitador. La TPCK-tripsina (Pierce) es el estándar general usado para las determinaciones de actividad de proteasa total. No obstante, las condiciones óptimas de actividad para proteasas específicas exigen el uso de la proteasa de interés. En el caso de los ensayos llevados a cabo en dichos experimentos, se utilizaron tanto la tripsina como la proteasa de interés para calibrar el ensayo. La exactitud del ensayo exige que las diluciones estándar hechas de 0.5 mg/mL de tripsina siempre den lugar a valores de absorbancia (a 450 nm) por debajo de 0.5.

[0230] Cada muestra se midió en relación con un control que no contenía caseína. El cambio observado de absorbancia ($\Delta\text{Abs}(450\text{ nm})$) explica la interferencia de los grupos amino de caseína. Asimismo, se corrigió también de este modo cualquier interferencia posible de los grupos amino primarios en el tampón y/u otros componentes del detergente. La actividad de todas las muestras se determinó en relación con el detergente sin metaloproteasa neutra añadida, así como para la enzima incubada en el tampón de borato BupH™ proporcionado con el kit, durante el mismo periodo de tiempo y a la misma temperatura.

[0231] Esta prueba es un ensayo de punto final, en el que se usaron 50 mM de tampón de borato, pH 8.5, a 32 °C. Los ensayos de proteasa se llevaron a cabo normalmente por duplicado. En la mayoría de experimentos para determinar las medidas de estabilidad, se diluyeron la proteína y el detergente por medio del tampón anteriormente mencionado en 1:1000, aunque en algunos experimentos las diluciones también fueron de 1:500 o 1:200, con el objetivo de conseguir lecturas en las que la absorbancia de los controles en blanco fuera inferior a 0.5. El espectrofotómetro de microtitulación usado en estos experimentos fue un SpectraMax250® (Molecular Devices) y todos los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de unión de proteínas media (Corning).

[0232] Los resultados para las muestras de proteínas estándares (por ejemplo, tripsina y metaloproteasa purificada) obtenidas en estos ensayos indicaron que existía una respuesta no lineal (puede que sea adecuada una escala lineal únicamente en un intervalo de ensayo reducido). Por ello, la curva se ajustó a una función cuadrática donde $f = y_0 + ax^2 + bx$; f se ajusta a y (SigmaPlot® v. 9; SPSS, Inc.). Por tanto, si se usaba una ecuación lineal para cuantificar la cantidad de proteína, se obtenían datos poco exactos; se observó que se necesitaba la ecuación cuadrática para obtener resultados exactos. Cabe resaltar que el inserto del kit del fabricante (Pierce) indica que puede que los resultados se ajusten, siendo «x» una escala logarítmica.

EJEMPLO 6**Efecto del pH y LAS sobre la actividad de la metaloproteasa neutra**

[0233] También se determinó el pH óptimo de la actividad para 0.36 mg/mL de nprE formulada. Los tampones investigados en este estudio fueron 50 mM de acetato sódico en el intervalo de pH de 3.5-5.5 ($\text{pK}_a = 4.76$), 50 mM de tampón MES en el intervalo de pH de 5.5 a 7.0 ($\text{pK}_a = 6.10$) y 50 mM de tampón Tris-HCl a pH 8.4. Se determinó que el pH óptimo para la nprE formulada se encontraba entre 5.5 y 6.0.

[0234] Se investigó el efecto del componente de detergente LAS sobre la actividad de 0.36 mg/ml de nprE formulada mediante incubación con LAS al 0 a 1 % (p/v). Los resultados se muestran en el gráfico que se proporciona en la Figura 2. Como indican estos resultados, el componente de detergente inactiva la proteasa de manera significativa, con lo que se hace necesario de este modo un medio para estabilizar la proteasa frente a este efecto perjudicial.

[0235] En algunos experimentos, se utilizó la composición de detergente líquido de alta densidad (HDL) denominada «TIDE® 2005», ofrecida por Procter & Gamble. Tal y como se suministró, este detergente contenía todos los componentes necesarios, salvo la metaloproteasa neutra de la presente invención.

Estabilidad en el almacenamiento en base de detergente líquido en función del tiempo

[0236] La prueba de estabilidad se llevó a cabo en un modo de minialmacenamiento. Las condiciones que iban a variar y las diversas concentraciones de sales de cloruro cálcico y de cinc que iban a añadirse se evaluaron por medio de una matriz diseñada con el *software* FusionPro™ (S-Matrix). La siguiente tabla resume las condiciones que se probaron para establecer la estabilidad en el almacenamiento a largo plazo de la metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens*.

Tabla 6. Condiciones de prueba de almacenamiento a largo plazo		
Condición	[CaCl ₂] (mM)	[ZnCl ₂] (mM)
1	15	-
2	7.5	7.5
3	-	15
4	-	-
5	12	3
6	-	-
7	-	15
8	7.5	7.5
9	15	-
10	15	15
11	12	3

[0237] El volumen final de cada condición sometida a prueba fue de 1 mL. TIDE® 2005 se dosificó con 0.36 mg de enzima/mL. El fluido de cultivo formulado y la metaloproteasa recombinante purificada se incubaron en la base de TIDE® 2005 a 32 °C durante un periodo de aproximadamente 4 semanas. La estabilidad en el almacenamiento de la metaloproteasa en detergente se comparó con la estabilidad de la metaloproteasa neutra en 50 mM de tampón MES, pH 5.8.

[0238] Antes de la prueba, las muestras se diluyeron 5 entre 1000 por medio de un tampón de ensayo (50 mM de tampón de borato, pH 8.5). Se determinó la actividad residual y se comparó en relación con la metaloproteasa neutra en el tampón de ensayo. Todas las medidas se determinaron por duplicado. Cada muestra se sometió a prueba en paralelo con los ensayos en blanco apropiados (es decir, el detergente, el tampón y cualquier aditivo necesario sometidos a prueba). A continuación, las muestras se sometieron a ensayo del modo descrito en las instrucciones que se proporcionan en el QuantiCleave™ Protease Assay Kit (Pierce).

[0239] En la Figura 22 se muestran los resultados de estas pruebas de estabilidad realizadas durante un periodo de 3-4 semanas. En TIDE® 2005, la metaloproteasa neutra en ausencia de iones (es decir, sin sal añadida) perdió rápidamente toda su actividad proteolítica/hidrolítica frente a la caseína. De hecho, se determinó que menos de un 20 % de la actividad permaneció tras menos de 1 hora de incubación. En contraste, la incubación de nprE en TIDE® 2005 que contenía iones de cinc (hasta 15 mM inclusive) estabilizó la proteasa y evitó la proteólisis durante un periodo de 7 días. Por ello, la presencia de iones de cinc en esta formulación funcionó bien a la hora de mantener al menos un 60 % de la actividad de proteasa. De manera similar, una concentración de 7.5 mM de iones de cinc dio lugar a un efecto de estabilización similar. Esta concentración de iones de cinc es muy baja y se contempla que se utilice en una variedad de formulaciones de detergente. En estos experimentos, no se produjo un efecto añadido por la inclusión de iones de calcio. Asimismo, la adición de iones de calcio que excediera los 15 mM y hasta 25 mM inclusive indujo la precipitación cuando se añadió a la base TIDE® 2005. Aunque no se pretende que la presente invención se vea limitada por ningún mecanismo en concreto, se contempló que la ausencia de efecto de la adición de iones de calcio en la estabilización de proteasa en dichos experimentos fue resultado de la composición detergente.

[0240] Para la termolisina, que presenta un 55 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens* (alineamiento de secuencias realizado por medio de CLUSTAL W, v. 1.82), se ha demostrado claramente que los iones de cinc resultan fundamentales para la actividad, mientras que los iones de calcio y la modificación por ingeniería genética de los sitios de unión a calcio han demostrado que desempeñan una función en la estabilización (véanse, por ejemplo, Mansfield., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:11152-11156 [1997]; y Van den Berg *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30:35-40 [1999]).

[0241] En formas de realización alternativas, otros cationes (por ejemplo, Co²⁺, Mn²⁺ y Fe²⁺) se utilizan en la presente invención para la estabilización de metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens*. Ello contrasta con datos anteriores que indican que ninguno de estos iones dio lugar a un restablecimiento al 100 % de la actividad específica (Holmquist. y Vallee, *J. Biol. Chem.*, 249:4601-4607 [1974]). Se contempla que dichos iones afectarán a la estabilidad al evitar el despliegue y posterior degradación proteolítica de la metaloproteasa. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se vea limitada por ningún mecanismo de actuación en concreto.

EJEMPLO 7

Producción de proteasa NprE en *B. subtilis* por medio del vector de expresión de nprE pUBnprE

- 5 [0242] En este Ejemplo, se describen los experimentos realizados para producir proteasa NprE en *B. subtilis*, en concreto los métodos usados en la transformación de plásmido pUBnprE en *B. subtilis*. La transformación se llevó a cabo del modo conocido en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 02/14490). La secuencia de ADN (secuencia de ADN de nprE líder, nprE pro y nprE madura de *B. amyloliquefaciens*) que se proporciona a continuación codifica la proteína precursora de NprE:

10

GTGGGTTTAGGTAAGAAATTGTCTGTTGCTGTCGCCGCTTCCTTTATGAGTTTAAAC
CATCAGTCTGCCGGGTGTTTCAGGCCGCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTG
ACGAATTTTGTACCGAAGCATTCTTTGGTGCAATCAGAATTGCCTTCTGTCACTGA
CAAAGCTATCAAGCAATACTTGAAACAAAACGGCAAAGTCTTTAAAGGCAATCCT
TCTGAAAGATTGAAGCTGATTGACCAAACGACCGATGATCTCGGCTACAAGCACT
TCCGTTATGTGCCTGTCTGTAACGGTGTGCCTGTGAAAGACTCTCAAGTCATTATT
CACGTCGATAAATCCAACAACGTCTATGCGATTAAACGGTGAATTAAACAACGATG
TTCCGCCAAAACGGCAAACAGCAAAAAATTATCTGCAAAATCAGGCGCTGGATCA
TGCTTATAAAGCGATCGGCAAATCACCTGAAGCCGTTTCTAACGGAACCGTTGCA
AACAAAAACAAAGCCGAGCTGAAAGCAGCAGCCACAAAAGACGGCAAATACCG
CCTCGCCTATGATGTAACCATCCGCTACATCGAACCGGAACCTGCAAACTGGGAA
GTAACCGTTGATGCGGAAACAGGAAAAATCCTGAAAAAGCAAAACAAAGTGGAG
CATGCCGCCACAACCGGAACAGGTACGACTCTTAAAGGAAAAACGGTCTCAT
TAAATATTTCTTCTGAAAGCGGCAAATATGTGCTGCGCGATCTTTCTAAACCT
ACCGGAACACAAATTATTACGTACGATCTGCAAAACCGCGAGTATAACCTGC
CGGGCACACTCGTATCCAGCACCAACAAACAGTTTACAACCTTCTTCTCAGCG
CGCTGCCGTTGATGCGCATTACAACCTCGGCAAAGTGTATGATTATTTCTAT
CAGAAGTTTAATCGCAACAGCTACGACAATAAAGGCGGCAAGATCGTATCCT
CCGTTTATTACGGCAGCAGATACAATAACGCAGCCTGGATCGGCGACCAAAT
GATTTACGGTGACGGCGACGGTTCATTCTTCTCACCTCTTTCCGGTTCAATG
GACGTAACCGCTCATGAAATGACACATGGCGTTACACAGGAAACAGCCAACC
TGAACCTACGAAAATCAGCCGGGCGCTTTAAACGAATCCTTCTCTGATGTATT
CGGGTACTTCAACGATACTGAGGACTGGGATATCGGTGAAGATATTACGGTC
AGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCTTATCCAATCCGACAAAATACGGACAGCCTG
ATAATTTCAAAAATTACAAAAACCTTCCGAACACTGATGCCGGCGACTACGG
CGGCGTGATACAAACAGCGGAATCCCGAACAAAGCCGCTTACAATACGATT
ACAAAAATCGGCGTGAACAAAGCGGAGCAGATTTACTATCGTGCTCTGACGG
TATACCTCACTCCGTCATCAACTTTTAAAGATGCAAAAGCCGCTTTGATTCAA
TCTGCGCGGGACCTTTACGGCTCTCAAGATGCTGCAAGCGTAGAAGCTGCCT
GGAATGCAGTCGGATTGTAA (SEQ ID NO:12)

15

- [0243] En la secuencia anterior, la negrita señala el ADN que codifica la proteasa NprE madura, la fuente estándar señala la secuencia líder (nprE líder) y el subrayado señala las secuencias pro (nprE pro). La secuencia de aminoácidos (secuencia de ADN de NprE líder, NprE pro y NprE madura) (SEQ ID NO:13) que se proporciona a continuación codifica la proteína precursora de NprE. En esta secuencia, el subrayado señala la secuencia pro y la negrita señala la proteasa NprE madura. La SEQ ID NO:17 proporciona la secuencia de NprE pro separada

de la secuencia de NprE madura y la SEQ ID NO:18 proporciona la secuencia de NprE madura. Esta secuencia se utilizó de base para la elaboración de las genotecas de variantes descritas en la presente memoria.

MGLGKKLSVAVAASFMSLTISLPGVQAAENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPSVSDK
AIKQYLKQNGKVFKGNPSERLKLIDQTTDDLGYKHFRYVPVVNGVPVKDSQVIIHVD
KSNNVYAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKNK
AELKAAATKDGGYRLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVDAETGKILKKQNKVEHAATTG
 TGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTTN
 QFTTSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRNSYDNKGGKIVSSVHYGSRYNNA
 AWIGDQMIYGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNE
 SFSDFGYFNDTEDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGPDPNFKNYKNLPNTDAG
 DYGGVHTNSGIPNKAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTPSSTFKDAKAAALIQ
 SARDLYGSQDAASVEAAWNAVGL (SEQ ID NO:13)

5

AENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPSVSDKAIKQYLKQNGKVFKGNPSERLKLIDQTT
 DDLGYKHFRYVPVVNGVPVKDSQVIIHVDKSNNVYAINGELNNDVSAKTANSKKLS
 ANQALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKNKAELKAAATKDGGYRLAYDVTIRYIEPE
 PANWEVTVDAETGKILKKQNKVEH (SEQ ID NO:17)

AATTGTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSST
 TNQFTTSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRNSYDNKGGKIVSSVHYGSRYNNA
 AWIGDQMIYGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFS
 DVFGYFNDTEDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGPDPNFKNYKNLPNTDAGDYGG
 VHTNSGIPNKAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTPSSTFKDAKAAALIQSARDLYG
 SQDAASVEAAWNAVGL (SEQ ID NO:18)

[0244] El vector de expresión de pUBnprE se construyó al amplificar el gen de nprE del ADN cromosómico de *B. amyloliquefaciens* por PCR por medio de dos cebadores específicos:

10 Oligo AB 1740: CTGCAGGAATTCAGATCTTAACATTTTTCCCCTATCATTTTTCCCG (SEQ ID NO:19)

Oligo AB 1741: GGATCCAAGCTTCCCGGGAAAAGACATATATGATCATGGTGAAGCC (SEQ ID NO:20)

[0245] La PCR se llevó a cabo en un termociclador con ADN polimerasa Phusion High Fidelity (Finnzymes). La mezcla de PCR contenía 10 µl de 5x tampón (Finnzymes Phusion), 1 µl de 10mM de dNTP, 1.5 µl de DMSO, 1 µl de cada cebador, 1 µl de ADN polimerasa Phusion de Finnzymes, 1 µl de solución de ADN cromosómico 50ng/µl, 34.5 µl de agua MilliQ. Se utilizó el siguiente protocolo:

15

Protocolo de PCR:

[0246]

20

- 1) 30 s 98 °C;
- 2) 10 s 98 °C;
- 3) 20 s 55 °C;
- 4) 1 min 72 °C;
- 5) 25 ciclos de los pasos 2 a 4; y
- 6) 5 min 72 °C.

25

[0247] Ello dio lugar a un fragmento de ADN de 1.9 kb que se digirió por medio de las enzimas de restricción del ADN *Bgl*II y *Bcl*I. El vector de *Bacillus* pUB 110 de copia múltiple (véase, por ejemplo, Gryczan, *J. Bacteriol.*,

134:318-329 [1978]) se digirió con *Bam*HI. El fragmento de PCR x *Bgl*II x *Bcl*I se ligó a continuación en el vector pUB 110 x *Bam*HI para formar el vector de expresión pUBnprE (véase la Figura 14).

[0248] pUBnprE se transformó en una cepa de *B. subtilis* (Δ prE, Δ nprE, oppA, Δ spolIE, degUHy32, Δ amyE::(*xy*IR,*pxy*IA-*com*K). La transformación en *B. subtilis* se llevó a cabo del modo descrito en el documento WO 02/14490. El cultivo selectivo de transformantes de *B. subtilis* que contenían el vector pUBnprE se llevó a cabo en matraces de agitación que contenían 25 ml de medio MBD (un medio definido basado en MOPS) con 20 mg/L de neomicina. El medio MBD se elaboró fundamentalmente del modo conocido en la técnica (véase Neidhardt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 119: 736-747 [1974]), salvo que NH_4Cl_2 , FeSO_4 y CaCl_2 se dejaron fuera del medio de base, se usaron 3 mM de K_2HPO_4 y el medio de base se complementó con 60 mM de urea, 75 g/L de glucosa y 1 % de soytone. Asimismo, los micronutrientes se hicieron como una solución madre de 100 X que contenía en un litro 400 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de 1M de CaCl_2 y 10 ml de 0.5 M de citrato de sodio. El cultivo se incubó durante tres días a 37 °C en una incubadora/agitador (Infors). Este cultivo dio lugar a la producción de proteasa NprE secretada con actividad proteolítica tal y como demuestran los ensayos de proteasas. Se llevó a cabo un análisis de gel por medio de los geles NuPage Novex 10 % Bis-Tris gels (Invitrogen, n.º cat. NP0301BOX). Para preparar muestras para el análisis, se mezclaron 2 volúmenes de sobrenadante con 1 volumen de 1M de HCl, 1 volumen de un tampón de muestra 4xLDS (Invitrogen, n.º cat. NP0007) y PMSF al 1 % (20 mg/ml) y posteriormente se calentaron durante 10 minutos a 70 °C. A continuación, se cargaron 25 μL de cada muestra en el gel, junto con 10 μL de SeeBlue más 2 estándares proteicos previamente manchados (Invitrogen, n.º cat. LC5925). Los resultados demostraron claramente que la estrategia de clonación de nprE descrita en este ejemplo generaba NprE activa producida por *B. subtilis*.

EJEMPLO 8

Generación de genotecas de evaluación del sitio (SEL) de nprE

[0249] En este Ejemplo, se describen los métodos usados en la construcción de SEL de nprE. El vector pUBnprE, que contenía el casete de expresión de nprE descrito anteriormente, sirvió de molde de ADN. Este vector contiene un único sitio de restricción de *Bgl*II, del cual se hizo uso en la construcción de la genoteca de evaluación del sitio.

[0250] Para generar las genotecas, se usó el vector de expresión pUBnprE, los cebadores, sintetizados en Invitrogen (desalados, escala de 50 nmol). Las secuencias de los cebadores se proporcionan en la Tabla 8-1.

[0251] Para construir una genoteca de evaluación del sitio de nprE, se llevaron a cabo tres reacciones de PCR, incluidas dos PCR de mutagénesis para introducir el codón de interés mutado en la secuencia de ADN de nprE madura y una tercera PCR para fusionar las dos PCR de mutagénesis para construir el vector de expresión pUBnprE, incluido el codón mutado deseado en la secuencia de nprE madura.

[0252] El método de mutagénesis estuvo basado en el enfoque de mutación centrado en el codón, en el que la creación de todas las mutaciones posibles en un momento en un triplete de ADN específico se llevó a cabo por medio de un cebador de oligonucleótidos directo e inverso de una longitud de 25 a 45 nucleótidos que encerraba una secuencia de ADN triple específicamente diseñada NNS ((A,C,T o G), (A,C,T o G), (C o G)) que se correspondía con la secuencia del codón que iba a mutarse y que garantizaba una incorporación aleatoria de nucleótidos en dicho codón específico de nprE madura. El número que aparece en los nombres de los cebadores (véase Tabla 8-1) se corresponde con la posición específica del codón de nprE madura.

[0253] Dos cebadores adicionales usados para construir las bibliotecas de evaluación del sitio contenían el sitio de restricción de *Bgl*II junto con una parte de la secuencia de ADN pUBnprE que flanqueaba el sitio de restricción de *Bgl*II. Estos cebadores fueron producidos por Invitrogen (escala de 50nmol, desalados) y se enumeran en la Tabla 8-1.

Tabla 8-1. Secuencias de cebadores

Nombre cebador	Secuencia de cebador y SEQ ID NO:
pUB-BglII-FW	GTCAGTCAGATCTTCCTTCAGGTTATGACC (SEQ ID NO:21)
pUB-BglII-RV	GTCTCGAAGATCTGATTGCTTAAGTCTTC (SEQ ID NO:22)
Cebadores de mutagénesis directos específicos de nprE	
nprE4F	GTGGAGCATGCCGCCACANNSSGGAACAGGTACGACTCTTAA (SEQ ID NO:23)

Cebadores de mutagénesis directos específicos de nprE	
nprE12F	CAGGTACGACTCTTAAANNSAAAACGGTCTCATTAAATAT (SEQ ID NO:24)
nprE13F	GTACGACTCTTAAAGGANNSACGGTCTCATTAAATATTTT (SEQ ID NO:25)
nprE14F	CGACTCTTAAAGGAAAANNSGTCTCATTAAATATTTT (SEQ ID NO:26)
nprE23F	CATTAAATATTTCTTCTGAANNSGGCAAATATGTGCTGCG (SEQ ID NO:27)
nprE24F	TAAATATTTCTTCTGAAAGCNNSAAATATGTGCTGCGCGATC (SEQ ID NO:28)
nprE33F	GTGCTGCGCGATCTTTCTNNSCCTACCGGAACACAAATTAT (SEQ ID NO:29)
nprE45F	AAATTATTACGTACGATCTGNNSAACCGCGAGTATAACCTG (SEQ ID NO:30)
nprE46F	TTATTACGTACGATCTGCAANNSCGCGAGTATAACCTGCC (SEQ ID NO:31)
nprE47F	CGTACGATCTGCAAAACNNSGAGTATAACCTGCCGGG (SEQ ID NO:32)
nprE49F	GATCTGCAAAACCGCGAGNNSAACCTGCCGGGCACACTC (SEQ ID NO:33)
nprE50F	CTGCAAAACCGCGAGTATNNSCTGCCGGGCACACTCGTATC (SEQ ID NO:34)
nprE54F	GAGTATAACCTGCCGGGCNNSCTCGTATCCAGCACCAC (SEQ ID NO:35)
nprE58F	CGGGCACACTCGTATCCNNSACCACAAACCAGTTTAC (SEQ ID NO:36)
nprE59F	GCACACTCGTATCCAGCNNSACAAACCAGTTTACAAC (SEQ ID NO:37)
nprE60F	CACTCGTATCCAGCACCNNSAACAGTTTACAACCTC (SEQ ID NO:38)
nprE65F	CCACAAACCAGTTTACANNSTCTTCTCAGCGCGCTGC (SEQ ID NO:39)
nprE66F	CAAACCAGTTTACAACNNSCTCAGCGCGCTGCCGTTG (SEQ ID NO:40)
nprE87F	GTGTATGATTATTTCTATNNSAAGTTTAATCGCAACAG (SEQ ID NO:41)
nprE90F	ATTATTTCTATCAGAAGTTTNNSCGCAACAGCTACGACAATAA (SEQ ID NO:42)
Nombre cebador	Secuencia de cebador y SEQ ID NO:
nprE96F	TTAATCGCAACAGCTACGACNNSAAAGGCGGCAAGATCGTATC (SEQ ID NO:43)
nprE97F	GCAACAGCTACGACAATNNSGGCGGCAAGATCGTATC (SEQ ID NO:44)
nprE100F	CTACGACAATAAAGGCGGCNNSATCGTATCCTCCGTTTAC (SEQ ID NO:45)
nprE186F	GAGGACTGGGATATCGGTNNSGATATTACGGTCAGCCAG (SEQ ID NO:46)
nprE196F	GTCAGCCAGCCGGCTCTCNNSAGCTTATCCAATCCGAC (SEQ ID NO:47)
nprE211F	GACAGCCTGATAATTTCNNSAATTACAAAAACCTTCC (SEQ ID NO:48)
nprE214F	GATAATTTCAAAAATTACNNSAACCTTCCGAACACTGATG (SEQ ID NO:49)
nprE228F	GCGACTACGGCGCGTGNNSACAAACAGCGGAATCCC (SEQ ID NO:50)
nprE280F	CTTTGATTCAATCTGCGNNSGACCTTTACGGCTCTCAAG (SEQ ID NO:51)
Cebadores de mutagénesis inversos específicos de nprE	
nprE4R	TTAAGAGTCGTACCTGTTCCSNNTGTGGCGGCATGCTCCAC (SEQ ID NO:52)
nprE12R	ATATTTAATGAGACCGTTTTSNNTTTAAGAGTCGTACCTG (SEQ ID NO:53)
nprE13R	GAAATATTTAATGAGACCGTSNNTCCTTTAAGAGTCGTAC (SEQ ID NO:54)
nprE14R	GAAATATTTAATGAGACSNNTTTTCTTTAAGAGTCG (SEQ ID NO:55)

Cebadores de mutagénesis inversos específicos de nprE	
nprE23R	CGCAGCACATATTTGCCSNNTTCAGAAGAAATATTTAATG (SEQ ID NO:56)
nprE24R	GATCGCGCAGCACATATTTSNNGCTTTCAGAAGAAATATTTA (SEQ ID NO:57)
nprE33R	ATAATTTGTGTTCCGGTAGGSNNAGAAAGATCGCGCAGCAC (SEQ ID NO:58)
nprE45R	CAGGTTATACTCGCGGTTSNNCAGATCGTACGTAATAATTT (SEQ ID NO:59)
nprE46R	GGCAGGTTATACTCGCGSNNTTGCAGATCGTACGTAATAA (SEQ ID NO:60)
nprE47R	CCCGGCAGGTTATACTCSNNGTTTTGCAGATCGTACG (SEQ ID NO:61)
nprE49R	GAGTGTGCCCCGGCAGGTTSNCTCGCGTTTTGCAGATC (SEQ ID NO:62)
nprE50R	GATACGAGTGTGCCCGGCAGSNNATACTCGCGGTTTTGCAG (SEQ ID NO:63)
Nombre cebador	Secuencia de cebador y SEQ ID NO:
nprE54R	GTGGTGCTGGATACGAGSNNGCCCGGCAGGTTATACTC (SEQ ID NO:64)
nprE58R	GTAAACTGGTTTGTGGTSNNGGATACGAGTGTGCCCG (SEQ ID NO:65)
nprE59R	GTTGTAAACTGGTTTGTSSNNGCTGGATACGAGTGTGC (SEQ ID NO:66)
nprE60R	GAAGTTGTAAACTGGTTSNNGGTGCTGGATACGAGTG (SEQ ID NO:67)
nprE65R	GCAGCGCGCTGAGAAGASNNTGTAAACTGGTTTGTGG (SEQ ID NO:68)
nprE66R	CAACGGCAGCGCGCTGAGASNAGTTGTAAACTGGTTTG (SEQ ID NO:69)
nprE87R	CTGTTGCGATTAACTTSNNATAGAAATAATCATACAC (SEQ ID NO:70)
nprE90R	TTATTGTCGTAGCTGTTGCGSNNAACCTTCTGATAGAAATAAT (SEQ ID NO:71)
nprE96R	GATACGATCTTGCCGCCTTSSNNGTCGTAGCTGTTGCGATTAA (SEQ ID NO:72)
nprE97R	GATACGATCTTGCCGCCSNNATTGTCTAGCTGTTGC (SEQ ID NO:73)
nprE100R	TAATGAACGGAGGATACGATSNNGCCGCCTTTATTGTCGTAG (SEQ ID NO:74)
nprE186R	CTGGCTGACCGTAATATCSNNACCGATATCCCAGTCCTC (SEQ ID NO:75)
nprE196R	GTCGGATTGGATAAGCTSNNGAGAGCCGGCTGGCTGAC (SEQ ID NO:76)
nprE211R	GGAAGGTTTTTGTAAATTSNNGAAATTATCAGGCTGTC (SEQ ID NO:77)
nprE214R	CATCAGTGTTGGAAGGTTSNNGTAATTTTTGAAATTATC (SEQ ID NO:78)
nprE228R	GGGATTCCGCTGTTTGTSSNACGCCGCCGTAGTCGC (SEQ ID NO:79)
nprE280R	CTTGAGAGCCGTAAAGGTCSNNCGCAGATTGAATCAAAG (SEQ ID NO:80)

[0254] La construcción de cada genoteca de evaluación del sitio comenzó con dos amplificaciones primarias por PCR por medio del cebador directo pUB-BgIII-FW y un cebador de mutagénesis inverso específico de nprE. Para la segunda PCR, se usó el cebador inverso pUB-BgIII -RV y un cebador de mutagénesis directo específico de nprE (las posiciones de codón de nprE madura son iguales para los cebadores de mutagénesis directos e inversos).

[0255] La introducción de las mutaciones en la secuencia de nprE madura se llevó a cabo mediante ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Finnzymes; n.º cat. F-530L). Todas las PCR se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo de Finnzymes que se facilitó con la polimerasa. Las condiciones de PCR para las PCR primarias fueron:

Para la PCR primaria 1:

[0256] Cebador directo pUB-BgIII-FW y un cebador de mutagénesis inverso específico de NPPE, ambos 1 µL (10 µM);

Para la PCR primaria 2:

[0257] Cebador inverso pUB-BgIII -RV y un cebador de mutagénesis directo específico de NPPE, ambos 1 µL (10 µM); junto con

	5x Tampón Phusion HF	10 µL
5	10 mM de mezcla de dNTP	1 µL
	ADN polimerasa Phusion	0.75 µL (2 unidades/ µL)
	DMSO, 100 %	1 µL
	ADN molde pUBnprE	1 µL (0.1 - 1 ng/ µL)
	Agua destilada en autoclave	hasta 50 µL

10 **[0258]** El programa de PCR fue de: 30 segundos 98 °C, 30x (10 segundos 98 °C, 20 segundos 55 °C, 1,5 minuto 72 °C) y 5 min 72 °C, llevado a cabo en un termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research). Los experimentos de PCR dan lugar a dos fragmentos de aproximadamente 2 a 3 kB, en los que se solaparon aproximadamente 30 bases nucleotídicas alrededor del codón de interés de NPPE madura. Los fragmentos se fusionaron en una tercera reacción de PCR por medio de los dos fragmentos mencionados anteriormente y los

15 cebadores directo e inverso de *Bg*II. La reacción de fusión de PCR se efectuó en la siguiente solución:

Cebador directo pUB-BgIII-FW y cebador inverso pUB-BgIII-RV, ambos 1 µL (10 µM)

[0259]

	5x Tampón Phusion HF	10 µL
20	10 mM de mezcla de dNTP	1 µL
	ADN polimerasa Phusion	0.75 µL (2 unidades/ µL)
	DMSO, 100 %	1 µL
	Mezcla de reacción de PCR primaria 1	1 µL (0.1 - 1 ng/ µL)
	Mezcla de reacción de PCR primaria 2	1 µL
25	Agua destilada en autoclave	hasta 50 µL

[0260] El programa de fusión de PCR fue del siguiente modo: 30 segundos 98 °C, 30x (10 segundos 98 °C, 20 segundos 55 °C, 2:40 minutos 72 °C) y 5 min 72 °C, en un termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research).

30 **[0261]** El fragmento lineal de 6.5 Kb amplificado se purificó por medio del kit de purificación Qiaquick PCR (Qiagen, n. ° cat. 28106) y se digirió con la enzima de restricción *Bg*II para crear extremos cohesivos a ambos lados del fragmento de fusión:

- 35 µL de fragmento de ADN lineal purificado
- 35 - 4 µL de tampón REACT® 3 (Invitrogen)
- 1 µL de *Bg*II, 10 unidades/ml (Invitrogen)

Condiciones de la reacción: 1 hora, 30 °C.

40 **[0262]** El ligamiento del fragmento digerido con *Bg*II y purificado por medio del kit de purificación Qiaquick PCR (Qiagen, n. ° cat. 28106) da lugar a un ADN circular y multimérico que contiene la mutación deseada:

- 30 µL de fragmento de ADN purificado digerido con *Bg*II
- 8 µL de tampón ADN ligasa de T4 (Invitrogen® n. ° cat. 46300-018)
- 45 - 1 µL ADN ligasa de T4, 1 unidad/µL (Invitrogen® n. ° cat. 15224-017)

Condiciones de la reacción: 16-20 horas, 16 °C

50 **[0263]** Posteriormente, la mezcla de ligamiento se transformó en una cepa de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoII E$, $degU Hy32$, $\Delta amyE::(xylR,pxyIA-comK)$). La transformación en *B. subtilis* se llevó a cabo del modo descrito en el documento WO 02/14490. Para cada genoteca, se seleccionaron y se cultivaron 96 colonias

sencillas en medios MOPS con neomicina y 1.25 g/L de extracto de levadura para fines de análisis de secuencia (BaseClear) y de cribado. Cada genoteca incluía un máximo de 19 variantes de *nprE* específicas de sitio.

[0264] Las variantes se produjeron al cultivar los transformantes de *B. subtilis* de SEL en MTP de 96 pocillos a 37 °C durante 68 horas en medio MBD con 20 mg/L de neomicina y 1.25 g/L de extracto de levadura (véase, supra).

EJEMPLO 9

Generación de genotecas combinatorias de *nprE* (RCL)

[0265] En este Ejemplo, se describen los métodos usados para generar genotecas combinatorias de *nprE*. Para esta enzima, se escogió una propiedad como la propiedad que necesitaba cambiarse en mayor grado. Esta propiedad se define en la presente memoria como la «propiedad primaria». El resto de propiedades fueron «propiedades secundarias» a efectos del diseño de la genoteca combinatoria. La estrategia básica para mejorar una proteína en la presente memoria fue la de combinar mutaciones que mejoran la propiedad primaria y asimismo mantener o mejorar las propiedades secundarias. Los datos de evaluación del sitio se utilizaron para identificar dichas mutaciones, lo que mejoró la propiedad primaria al tiempo que mantuvo o mejoró las propiedades secundarias. Las mutaciones que se iban a combinar se identificaron por medio de su índice de rendimiento (PI o P_i) y valores de $\Delta\Delta G_{app}$ asociados.

[0266] El «cambio de energía libre aparente» ($\Delta\Delta G_{app}$) en el sentido en que se usa en la presente memoria se define como:

$$\Delta\Delta G_{app} = -RT \ln \left(\frac{P_{\text{variante}}}{P_{\text{progenitora}}} \right)$$

donde P_{variante} es el valor de rendimiento de la variante y $P_{\text{progenitora}}$ es el valor de rendimiento de la enzima progenitora en las mismas condiciones. La relación $P_{\text{variante}}/P_{\text{progenitora}}$ se define como el índice de rendimiento (P_i) de la propiedad. Se esperaba que los valores de $\Delta\Delta G_{app}$ se comportaran de un modo similar a los valores de $\Delta\Delta G$ reales para las distribuciones de datos y efecto acumulativo. No obstante, dado que $\Delta\Delta G$ representa la cantidad máxima de trabajo que la variante puede efectuar en comparación con la enzima progenitora, la magnitud $\Delta\Delta G_{app}$ por lo general subestima el $\Delta\Delta G$ y puede que conduzca a resultados que parecen sinérgicos en el sentido de que las propiedades de dos posiciones acumulativas puede que sean mayores que el valor previsto al añadir juntos sus valores de $\Delta\Delta G_{app}$.

[0267] Por ejemplo, cuando la estabilidad de TIDE® es la propiedad primaria y la actividad de BMI es la propiedad secundaria, puede que se escojan para la combinación las mutaciones que presentan valores de $\Delta\Delta G_{app} < 0$ ($P_i > 1$) y valores de $\Delta\Delta G_{app}$ de BMI < 0.06 ($P_i > 0.9$). De hecho, en estos experimentos se exploraron dichas relaciones.

[0268] Para producir las variantes utilizadas en estos experimentos, GeneArt (Geneart) produjo fragmentos de genoteca de *nprE* sintética, que contenían múltiples mutaciones en múltiples posiciones de ADN de *nprE* madura. Estos fragmentos de genoteca de *nprE* de 1.5 kB se digirieron con las enzimas de restricción de ADN *PvuI* y *AvaI*, se purificaron y ligaron en el fragmento de vector pUB de 5 kB (también digerido con enzimas de restricción de ADN *PvuI* y *AvaI*) mediante una reacción de ligasas por medio de ADN ligasa de T4 (Invitrogen® n.º cat. 15224-017).

[0269] Para transformar directamente la mezcla de reacción de ligamiento en células *Bacillus*, el ADN de genoteca (la mezcla de fragmento de genoteca de *nprE* ligada en el fragmento de vector pUB) se amplificó por medio del kit TempliPhi (Amersham cat. n.º 25-6400). A estos efectos, se mezcló 1 µL de la mezcla de reacción de ligamiento con 5 µL de tampón de muestra del kit TempliPhi y se calentó durante 3 minutos a 95 °C para desnaturalizar el ADN. La reacción se colocó sobre hielo para enfriarse durante 2 minutos y a continuación se centrifugó brevemente. Después, se añadieron 5 µL de tampón de reacción y 0.2 µL de polimerasa de phi29 del kit TempliPhi y las reacciones se incubaron a 30 °C en un termociclador de MJ Research durante 4 horas. La enzima de phi29 se inactivó mediante calor en las reacciones por medio de la incubación a 65 °C durante 10 min en el termociclador.

[0270] Para la transformación de las genotecas en *Bacillus*, se mezcló 0.1 µL de producto de reacción de amplificación de TempliPhi con 500 µL de células de *B. subtilis* competentes ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, *oppA*, $\Delta spoII E$, *degU Hy32*, $\Delta amyE::(xylR,pxyIA-comK)$) seguido de una agitación enérgica a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se colocaron 100 y 500 µL en placas HI-agar que contenían 20 mg/L de neomicina y leche

desnatada al 0.5 %. En general, la transformación a *B. subtilis* se llevó a cabo del modo descrito en el documento WO 02/14490. Se contempla que las genotecas combinatorias de nprE de *B. subtilis* construidas mediante este método contengan aminoácidos naturales en una o varias de las posiciones localizadas para la mutagénesis.

- 5 **[0271]** A continuación, las variantes obtenidas en dichas genotecas se sometieron a prueba para comprobar su estabilidad en TIDE® y su rendimiento en pruebas de rendimiento de lavado de BMI del modo descrito en la presente memoria. La Tabla 9 proporciona índices de rendimiento de las variantes sometidas a prueba en el ensayo de BMI. En esta Tabla, «Pos.» indica la posición en la secuencia de aminoácidos de NprE que se cambió, y «AA» indica la sustitución de aminoácidos realizada para cada variante.

10

Tabla 9. Resultados (índices de rendimiento) de las variantes sometidas a prueba								
Pos.	Variante	AA	TIDE (-)	$\Delta\Delta G$ TIDE(-)	TIDE(+)	$\Delta\Delta G$ TIDE(+)	Pi BMI	$\Delta\Delta G$ BMI
4	T004L	L	0.80	0.13	1.13	-0.07	1.01	0.00
23	S023Y	Y	1.08	-0.05	1.13	-0.07	1.02	-0.01
23	S023W	W	1.12	-0.07	1.13	-0.07	1.29	-0.15
23	S023N	N	1.33	-0.17	1.10	-0.06	0.95	0.03
23	S023T	T	0.88	0.07	1.06	-0.03	0.91	0.05
23	S023G	G	1.29	-0.15	1.06	-0.03	0.92	0.05
23	S023R	R	0.98	0.01	1.06	-0.03	1.46	-0.22
23	S023L	L	0.90	0.06	1.03	-0.02	1.24	-0.13
23	S023M	M	1.04	-0.02	1.03	-0.02	1.09	-0.05
23	S023V	V	0.82	0.12	1.02	-0.01	0.93	0.04
23	S023K	K	1.01	-0.01	1.02	-0.01	1.50	-0.24
24	G024Y	Y	0.60	0.30	1.11	-0.06	1.10	-0.06
24	G024W	W	0.36	0.60	1.10	-0.06	1.20	-0.11
24	G024M	M	0.71	0.20	1.09	-0.05	1.12	-0.07
24	G024F	F	0.50	0.41	1.08	-0.04	1.19	-0.10
24	G024L	L	0.49	0.42	1.07	-0.04	1.22	-0.12
24	G024H	H	0.80	0.13	1.05	-0.03	1.17	-0.09
24	G024K	K	0.55	0.35	1.04	-0.02	1.55	-0.26
24	G024T	T	0.57	0.33	1.03	-0.02	0.94	0.04
24	G024R	R	0.56	0.34	1.02	-0.01	1.47	-0.23
46	N046Q	Q	0.88	0.08	1.07	-0.04	1.22	-0.12
47	R047K	K	1.12	-0.07	1.09	-0.05	1.15	-0.08
50	N050F	F	1.07	-0.04	1.07	-0.04	1.38	-0.19
50	N050Y	Y	1.00	0.00	1.04	-0.02	1.27	-0.14
50	N050W	W	1.01	-0.01	1.04	-0.02	1.46	-0.22
50	N050P	P	1.23	-0.12	1.03	-0.02	1.12	-0.07
54	T054H	H	1.08	-0.04	1.11	-0.06	1.17	-0.09
54	T054K	K	1.03	-0.02	1.11	-0.06	1.47	-0.23
54	T054L	L	1.09	-0.05	1.08	-0.05	1.26	-0.14
54	T054N	N	0.97	0.02	1.07	-0.04	1.25	-0.13
54	T054Y	Y	1.14	-0.08	1.07	-0.04	1.08	-0.04
54	T054W	W	1.02	-0.01	1.07	-0.04	1.22	-0.12
54	T054S	S	0.99	0.01	1.05	-0.03	1.03	-0.02
54	T054I	I	1.09	-0.05	1.04	-0.02	1.34	-0.17
54	T054R	R	0.96	0.02	1.04	-0.02	1.46	-0.22

Tabla 9. Resultados (índices de rendimiento) de las variantes sometidas a prueba								
Pos.	Variante	AA	TIDE (-)	$\Delta\Delta G$ TIDE(-)	TIDE(+)	$\Delta\Delta G$ TIDE(+)	Pi BMI	$\Delta\Delta G$ BMI
54	T054Q	Q	1.09	-0.05	1.03	-0.02	1.23	-0.12
54	T054F	F	0.98	0.01	1.03	-0.02	1.16	-0.09
54	T054V	V	1.14	-0.08	1.01	-0.01	1.11	-0.06
59	T059R	R	0.76	0.16	1.28	-0.14	1.56	-0.26
59	T059W	W	0.56	0.34	1.26	-0.14	1.32	-0.16
59	T059K	K	0.99	0.00	1.16	-0.09	1.60	-0.28
59	T059N	N	0.98	0.01	1.15	-0.08	1.16	-0.09
59	T059G	G	0.94	0.04	1.13	-0.07	1.11	-0.06
59	T059P	P	1.18	-0.10	1.12	-0.07	1.19	-0.10
59	T059M	M	1.04	-0.02	1.10	-0.06	1.10	-0.05
59	T059H	H	0.98	0.01	1.07	-0.04	1.32	-0.16
59	T059S	s	1.09	-0.05	1.04	-0.03	0.91	0.06
59	T059A	A	1.05	-0.03	1.04	-0.02	0.96	0.03
59	T059Q	Q	1.05	-0.03	1.04	-0.02	1.31	-0.16
59	T059I	I	0.64	0.26	1.01	-0.01	1.43	-0.21
60	T060N	N	0.79	0.14	1.03	-0.02	1.07	-0.04
66	S066Q	Q	0.75	0.17	1.01	-0.01	1.12	-0.07
66	S066N	N	1.08	-0.05	1.01	-0.01	1.00	0.00
110	R110K	K	1.08	-0.04	1.04	-0.02	1.05	-0.03
119	D119H	H	1.03	-0.02	1.15	-0.08	1.16	-0.09
129	S129I	I	2.32	-0.49	1.68	-0.30	0.98	0.01
129	S129V	V	2.34	-0.50	1.55	-0.26	1.01	0.00
129	S129Q	Q	1.86	-0.37	1.44	-0.21	0.99	0.00
129	S129T	T	1.59	-0.27	1.36	-0.18	1.04	-0.02
129	S129L	L	1.70	-0.31	1.35	-0.18	1.01	-0.01
129	S129H	H	1.60	-0.28	1.30	-0.15	1.17	-0.09
129	S129Y	Y	1.28	-0.14	1.06	-0.04	1.25	-0.13
129	S129A	A	1.13	-0.07	1.06	-0.03	1.12	-0.07
129	S129K	K	1.18	-0.10	1.05	-0.03	1.33	-0.17
130	F130L	L	1.29	-0.15	1.52	-0.25	0.91	0.05
130	F130I	I	1.18	-0.10	1.14	-0.08	1.03	-0.02
130	F130V	V	1.05	-0.03	1.06	-0.03	0.99	0.00
130	F130K	K	0.99	0.00	1.04	-0.02	1.26	-0.14
138	M138L	L	1.11	-0.06	1.43	-0.21	0.95	0.03
152	E152H	H	1.53	-0.25	1.36	-0.18	1.15	-0.08
152	E152W	w	1.32	-0.16	1.31	-0.16	1.06	-0.03
152	E152F	F	1.32	-0.16	1.15	-0.08	1.09	-0.05
179	T179P	P	1.33	-0.17	1.50	-0.24	1.04	-0.03
190	V190I	I	1.37	-0.18	1.68	-0.30	1.16	-0.09
220	D220P	P	2.24	-0.47	2.66	-0.57	1.05	-0.03
220	D220E	E	2.23	-0.47	2.44	-0.52	1.05	-0.03
243	T243I	I	1.13	-0.07	1.17	-0.09	1.06	-0.03

Tabla 9. Resultados (índices de rendimiento) de las variantes sometidas a prueba								
Pos.	Variante	AA	TIDE (-)	$\Delta\Delta G$ TIDE(-)	TIDE(+)	$\Delta\Delta G$ TIDE(+)	Pi BMI	$\Delta\Delta G$ BMI
263	T263W	w	1.37	-0.18	1.40	-0.20	0.92	0.05
263	T263H	H	1.03	-0.02	1.01	-0.01	1.05	-0.01
273	A273H	H	1.10	-0.06	1.14	-0.08	0.98	0.01
282	L282M	M	1.03	-0.01	1.16	-0.09	1.01	-0.01
282	L282F	F	0.91	0.05	1.06	-0.04	1.09	-0.05
282	L282Y	Y	0.83	0.11	1.04	-0.02	0.92	-0.05
285	S285R	R	1.08	-0.04	1.38	-0.19	1.23	-0.12
285	S285P	P	1.11	-0.06	1.30	-0.16	0.98	0.01
285	S285W	W	1.08	-0.05	1.28	-0.14	0.95	0.03
285	S285Q	Q	1.06	-0.03	1.10	-0.05	0.98	0.01
285	S285K	K	0.89	0.07	1.00	0.00	1.20	-0.10
286	Q286R	R	0.95	0.03	1.18	-0.10	1.14	-0.08
286	Q286P	P	0.98	0.01	1.15	-0.08	0.97	0.02
286	Q286K	K	0.93	0.04	1.09	-0.05	1.22	-0.12

EJEMPLO 10

Método alternativo para generar genotecas de evaluación del sitio (SEL) de nprE por medio de mutagénesis QuikChange®

[0272] En este Ejemplo, se describen métodos alternativos para generar SEL de nprE. Como en el Ejemplo 8 anterior, el vector pUBnprE sirvió de fuente de ADN molde para generar las SEL de nprE. La principal diferencia entre los dos métodos estriba en que este método necesita la amplificación del vector completo por medio de cebadores mutagénicos dirigidos al sitio complementarios.

Materiales:

[0273]

Cepa de *Bacillus* que contiene el vector pUBnprE

Kit Midi de plásmido Qiagen (Qiagen n.º cat. 12143)

Lisozima Ready-Lyse (Epicentre n.º cat. R1802M)

Kit de dam metilasa (New England Biolabs n.º cat. M0222L)

Kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean (Zymo Research n.º cat. D4001)

Cebadores mutagénicos dirigidos al sitio de nprE, escala 100 nmol, extremo 5' fosforilado, purificación por PAGE (Integrated DNA Technologies, Inc.)

Kit de mutagénesis dirigida al sitio múltiple QuikChange (Stratagene n.º cat. 200514)

Termociclador MJ Research PTC-200 Peltier (Bio-Rad Laboratories)

Geles E de agarosa al 1.2 % (Invitrogen n.º cat. G5018-01)

Kit de amplificación TempliPhi (GE Healthcare n.º cat. 25-6400-10)

Células de *B. subtilis* competentes ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoII E$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR,pxyIA-comK)$)

Métodos:

[0274] Para obtener el vector pUBnprE, se usó una colonia sencilla de una cepa de *Bacillus* que contenía el vector pUBnprE para inocular un tubo de neomicina de 5 ml de LB + 10 ppm. Este fue el cultivo iniciador usado en dichos métodos. El cultivo se dejó cultivar toda la noche a 37 °C, con una agitación a 225 rpm durante 6 horas. A continuación, se inocularon 100 ml de LB fresco + 10 ppm de neomicina con 1 ml del cultivo iniciador. Este cultivo se dejó cultivar toda la noche a 37 °C, con una agitación a 225 rpm. Tras esta incubación, se recolectó el sedimento celular por centrifugación suficiente para proporcionar un sedimento celular. El sedimento celular se volvió a suspender en 10 ml de tampón P1 (Kit Midi de plásmido Qiagen). A continuación, se añadieron 10 ul de lisozima Ready-Lyse al sedimento celular suspendido de nuevo y se incubó a 37 °C durante 30 min. Después, continuó el protocolo del kit Midi de plásmido Qiagen (utilizando 10 ml de tampón P2 y P3 para explicar el aumento de volumen del cultivo celular). Tras el aislamiento del vector pUBnprE de *Bacillus*, se cuantificó la concentración de vector pUBnprE. El vector se *dam* metiló por medio del kit de *dam* metilasa (New England Biolabs), mediante los métodos expuestos en los protocolos del kit, para efectuar la metilación de aproximadamente 2 ug de vector pUBnprE por tubo. Se usó el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean para purificar y concentrar el vector pUBnprE *dam* metilado. El vector pUBnprE *dam* metilado se cuantificó y luego se diluyó a una concentración de trabajo de 50ng/ul. Se usaron los cebadores mutagénicos dirigidos al sitio complementarios (1 ul de cada cebador a 10uM) (véase Tabla 10-1) en una reacción de PCR en el kit de mutagénesis dirigida al sitio múltiple QuikChange (Stratagene), siguiendo el protocolo del fabricante (por ejemplo, 1 ul de vector pUBnprE *dam* metilado (50 ng/ul), 1 ul de cebador mutagénico directo dirigido al sitio de nprE (10uM), 1ul de cebador mutagénico directo dirigido al sitio de nprE (10 uM), 2.5 ul de 10x tampón de reacción múltiple QuikChange, 1 ul de mezcla de dNTP, 1 ul de mezcla de enzima múltiple QuikChange (2.5 U/ul) y 17.5 ul de agua destilada en autoclave para proporcionar una mezcla de reacción total de 25 ul). Las genotecas de evaluación del sitio de nprE se amplificaron por medio de las siguientes condiciones: 95 °C, durante 1 min (solo primer ciclo), seguido de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 65 °C durante 13 ½ min, y repetir el ciclo 23 veces. El producto de reacción se almacenó a 4 °C toda la noche. A continuación, la mezcla de reacción se sometió a un tratamiento de digestión con *DpnI* (facilitado con el kit de mutagénesis dirigida a sitio múltiple QuikChange) para digerir el vector pUBnprE parental, mediante el protocolo del fabricante (es decir, se añadió 1.5 ul de enzima de restricción *DpnI* a cada tubo y se incubó a 37 °C durante 3 horas; después se analizaron 2 ul de la reacción de PCR de digestión con *DpnI* en un gel E al 1.2 % para cada SEL de nprE para asegurarse de que la reacción de PCR había funcionado y que el molde parental se había degradado). Luego se usó la amplificación por círculo rodante TempliPhi para generar grandes cantidades de ADN para aumentar el tamaño de la genoteca de cada SEL de nprE, valiéndose del protocolo del fabricante (es decir, 1 ul de PCR de mutagénesis dirigida al sitio múltiple QuikChange tratada con *DpnI*, 5 ul de tampón de muestra TempliPhi, 5 ul de tampón de reacción TempliPhi y 0.2 ul de mezcla enzimática TempliPhi, para una reacción total de ~11 ul; incubación a 30 °C durante 3 horas; la reacción TempliPhi se diluyó al añadir 200 ul de agua destilada en autoclave y se sometió brevemente a agitación vortical. A continuación, se transformó 1.5 ul del material diluido TempliPhi en células de *B. subtilis* competentes y se seleccionaron SEL de nprE para utilizar placas de LA + 10 ppm de neomicina + leche desnatada al 1.6 %. La Tabla 10-1 proporciona los nombres, secuencias y SEQ ID NOS de los cebadores usados en dichos experimentos. La síntesis de todos los cebadores la efectuó Integrated DNA Technologies, en una escala de 100 nmol, extremo 5' fosforilado y purificación por PAGE.

Tabla 10-1. Cebadores	
CEBADOR	SECUENCIA
nprE-T4F	GTGGAGCATGCCGCCACANNSSGGAACAGGTACGACTCTTAAAGG (SEQ ID NO:81)
nprE-G12F	CCGGAACAGGTACGACTCTTAAANNSSAAACGGTCTCATTAAATATTTCTTCTGAAAGC (SEQ ID NO:82)
nprE-Q45F	CGGAACACAAATATTACGTACGATCTGNNSAACCGCGAGTATAACCTGCC (SEQ ID NO:83)
nprE-Y49F	ACCGCGAGNNSAACCTGCCGGGCACACTCGTATCC (SEQ ID NO:84)
nprE-N50F	GTACGATCTGCAAAAACGCGAGTATNNSCTGCCGGGCACACTCGTATCCAG (SEQ ID NO:85)
nprE-T65F	CCAGCACCAACACAGTTTACANNSTCTTCTCAGCGCGCTGCCGTTG (SEQ ID NO:86)
nprE-D119F	GCAGATACAAATAACGCAGCCTGGATCGGCNNSCAAAATGATTACGGTGACGGCGAC (SEQ ID NO:87)
nprE-G128F	CCAAATGATTTACGGTGACGGCGACNNSCTATCTTCTCACCTCTTCCGGTTC (SEQ ID NO:88)
nprE-F130F	GGTGACGGCGACGGTTCAANNSTTCTCACCTCTTCCGGTCC (SEQ ID NO:89)
nprE-Q151F	CATGAAATGACACATGGCGTTACANNSSGAAACAGCCAACTGAACCTAC (SEQ ID NO:90)
nprE-E152F	CATGAAATGACACATGGCGTTACACAGNNSACAGCCAACTGAACCTACG (SEQ ID NO:91)
nprE-N155F	CATGGCGTTACACAGGAAACAGCCNNSCTGAACTACGAAATCAGCCG (SEQ ID NO:92)
nprE-T179F	CTGATGTATTCGGGTACTTCAACGATNNSGAGGACTGGGATATCGGTG (SEQ ID NO:93)
nprE-Y204F	GCAGCTTATCCAA TCCGACAAAANNSSGGACAGCCTGATAATTTCAAAAATTAC (SEQ ID NO:94)
nprE-G205F	GCAGCTTATCCAA TCCGACAAAATAACNNSCAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAACC (SEQ ID NO:95)
nprE-Y224F	GAACACTGATGCCGGCGACNNSGGCGGCGTGCATACAAAC (SEQ ID NO:96)
nprE-T243F	GAACAAAGCCGCTTACAATACGATTNNSAAAATCGGGCGTGAACAAAGCG (SEQ ID NO:97)
nprE-V260F	GCAGATTTACTATCGTCTGTGACGNNSTACCTCACTCCGTCATCAACTTTTAAAG (SEQ ID NO:98)
nprE-Y261F	GATTTACTATCGTCTGTGACGGTANNSTCACTCCGTCATCAACTTTTAAAG (SEQ ID NO:99)
nprE-T263F	GTGCTCTGACGGTATACCTCNNSCCGTCATCAACTTTTAAAGATGC (SEQ ID NO:100)
nprE-A273F	CCGTCACTCAACTTTTAAAGATGCAAAANNSTGCTTTGATTCAATCTGCGCGG (SEQ ID NO:101)
nprE-L282F	GATTCAAATCTGCGCGGACNNSACGGCTCTCAAGATGCTGC (SEQ ID NO:102)
nprE-S285F	CGCGGGACCTTTACGGCNNSCAAGATGCTGCAAGCGTAG (SEQ ID NO:103)
nprE-A289F	CCTTTACGGCTCTCAAGATGCTNNSAGCGTAGAAGCTGCCTGGAATG (SEQ ID NO:104)
nprE-A293F	CTCAAGATGCTGCAAGCGTAGAANNSTGCTGGAATGCGGATG (SEQ ID NO:105)

(continuación)

Tabla 10-1. Cebadores	
CEBADOR	SECUENCIA
nprE-N296F	GCAAGCGTAGAAGCTGCCGTGNNSGCAGTCGGATTGTAAACAAGAAAAG (SEQ ID NO:106)
nprE-G299F	GAAGCTGCCTGGAATGCAGTCNNSTTGAAACAAGAAAAGAGACCGGAAATCC (SEQ ID NO:107)
nprE-T60F	CACACTCGTATCCAGCACCCNNSAACAGTTTACAACCTCTTCTCAG (SEQ ID NO:108)
nprE-R110F	CTCCGTTCAATTACGGCAGCENNSTACAATAACGCAGCCTGGATC (SEQ ID NO:109)
nprE-D139F	CTCACCTCTTTCCGGTTCAATGNNSGTAAACCGCTCATGAAATGACAC (SEQ ID NO:110)
nprE-T4R	CCTTTAAGAGTCGTACCTGTTCCSNNGTGGCGGCATGCTCCAC (SEQ ID NO:111)
nprE-G12R	GCTTTCAGAAGAAATATTTAATGAGACCGTTTTNNNTTAAAGAGTCGTACCTGTTCGG (SEQ ID NO:112)
nprE-Q45R	GGCAGGTTATACTCGCGGTTSNNCAGATCGTACGTAA TAATTTGTGTTCCG (SEQ ID NO:113)
nprE-Y49R	GGATACGAGTGTGCCCGCAGGTTSNNTCGCGGTTTTGCAGATCGTAC (SEQ ID NO:114)
nprE-N50R	CTGGATACGAGTGTGCCCGGCAGSNNATACCGCGGTTTTGCAGATCGTAC (SEQ ID NO:115)
nprE-T65R	CAACGGCAGCGCGCTGAGAAGASNNGTAAACTGGTTTGTGGTGCTGG (SEQ ID NO:116)
nprE-D119R	GTCGCCGTACCCGTAAATCATTTGSNNGCCGATCCAGGTCGGTTATGTATCTGC (SEQ ID NO:117)
nprE-G128R	GAACCGGAAAGAGGTGAGAAGAATGASNNGTCCCGTCAACCGTAAATCATTTGG (SEQ ID NO:118)
nprE-F130R	GGACCGGAAAGAGGTGAGAASNNGTGAACCGTCGCCGTCACC (SEQ ID NO:119)
nprE-Q151R	GTAGTTCAGGTTGGCTGTTTCSNNTGTAAACGCCATGTGTCATTTTCATG (SEQ ID NO:120)
nprE-E152R	CGTAGTTCAGGTTGGCTGTSNNTGTGTAAACGCCATGTGTCATTTTCATG (SEQ ID NO:121)
nprE-N155R	CGGCTGATTTTCGTAGTTCAGSNNGGCTGTTTCCTGTGTAAACGCCATG (SEQ ID NO:122)
nprE-T179R	CACCGATATCCAGTCCTCSNNATCGTTGAAGTACCCGAATACATCAG (SEQ ID NO:123)
nprE-Y204R	GTAATTTTGAATTTTGAATAATCAGGCTGCCSNNTTTTGTCCGATTGGATAAGCTGC (SEQ ID NO:124)
nprE-G205R	GGTTTTTGTAAATTTTGAAATTAATCAGGCTGSNNGTATTTTGTCCGATTGGATAAGCTGC (SEQ ID NO:125)
nprE-Y224R	GTTTGATGCAACGCCGCCSNNGTGCCCGGCATCAGTGTTTC (SEQ ID NO:126)
nprE-T243R	CGCTTTGTTACGCCCGATTTTNNAAATCGTATTGTAAGCGGCTTTGTTTC (SEQ ID NO:127)
nprE-V260R	CTTTAAAAGTTGATGACGGAGTGAGGTASNNCGTCAGAGCACGATAGTAAATCTGC (SEQ ID NO:128)
nprE-Y261R	CTTTAAAAGTTGATGACGGAGTGAGSNNATACCGTCAGAGCACGATAGTAAATC (SEQ ID NO:129)

(continuación)

Tabla 10-1. Cebadores	
CEBADOR	SECUENCIA
nprE-T263R	GCATCTTTAAAAGTTGATGACGGSNNAGGTATACCGTCAGAGCAC (SEQ ID NO:130)
nprE-A273R	CCGCGCAGATTGAATCAAAAGCSNNTTTTGATCTTTAAAGTTGATGACGG (SEQ ID NO:131)
nprE-L282R	GCAGCATCTTGAGAGCGGTASNNGTCCCGCGCAGATTGAATC (SEQ ID NO:132)
nprE-S285R	CTACGCTTGAGCATCTTGSNNGCCGTAAAGGTCCCGCG (SEQ ID NO:133)
nprE-A289R	CATTCCAGGCAGCTTCTACGCTSNAGCATCTTGAGAGCCGTAAAGG (SEQ ID NO:134)
nprE-A293R	CAATCCGACTGCATTCAGGCSNNTTCTACGCTTGAGCATCTTGAG (SEQ ID NO:135)
nprE-N296R	CTTTCTTGTTTACAAATCCGACTGCSNNCCAGCGCTTCTACGCTTGC (SEQ ID NO:136)
nprE-G299R	GGATTTCCGGTCTCTTTCTTGTTTACAASNGACTGCATTCAGGCGACTTC (SEQ ID NO:137)
nprE-T60R	CTGAGAAAGAGTTGTAAACTGGTTSNNGGTGCTGGATACGAGTGTG (SEQ ID NO:138)
nprE-R110R	GATCCAGGCTGCGTTATTGTASNNGTGCCGTAAAGAAGGAG (SEQ ID NO:139)
nprE-D139R	GTGTCAATTCATGAGCGGTTACSNNCATTGAACCGGAAAGAGGTGAG (SEQ ID NO:140)
nprE-S135F	GCGACGGTTCAATCTCTCACCTCTTNSGGTTCAATGGACGTAAACCGCTC (SEQ ID NO:141)
nprE-G136F	GCGACGGTTCAATCTCTCACCTCTTTCNNSTCAATGACGTAAACCGCTCATG (SEQ ID NO:142)
nprE-S137F	CTTCTCACCTCTTTCGGTNNATGGACGTAACCGCTCATG (SEQ ID NO:143)
nprE-V140F	CTCTTTCCGGTTCAATGGACNNSACCGCTCATGAAATGACAC (SEQ ID NO:144)
nprE-S197F	CAGCCAGCCGGCTCTCCGCNNSTTATCCAATCCGACAAAATACGGACAG (SEQ ID NO:145)
nprE-L198F	CAGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCNSNSTCCAAATCCGACAAAATACGGACAG (SEQ ID NO:146)
nprE-S199F	CAGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCTTANNAAATCCGACAAAATACGGACAGCC (SEQ ID NO:147)
nprE-L216F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTTACAAAAAANNSSCCGAACACTGATGCCGGCGAC (SEQ ID NO:148)
nprE-P217F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTTACAAAAAACCCTTNSAACACTGATGCCGGCGAC (SEQ ID NO:149)
nprE-N218F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTTACAAAAAACCCTTCCGNSACTGATGCCGGCGACTAC (SEQ ID NO:150)
nprE-T219F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTTACAAAAAACCCTTCCGAACNNSGATGCCGGCGACTACGG (SEQ ID NO:151)
nprE-D220F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTTACAAAAAACCCTTCCGAACACTNNSGCCGGCGACTACGGCGGCG (SEQ ID NO:152)
nprE-A221F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTTACAAAAAACCCTTCCGAACACTGATNNSGCCGGCGACTACGGCGGCGTG (SEQ ID NO:153)

(continuación)

Tabla 10-1. Cebadores	
CEBADOR	SECUENCIA
nprE-G222F	CCTTCCGAACACTGATGCCNNSGACTACGGCGGCTGCATAC (SEQ ID NO:154)
nprE-Q286F	CGGGACCTTTACGGCTCTNNSGATGCTGCAAGCGTAGAAGCTG (SEQ ID NO:155)
nprE-A297F	GCGTAGAAGCTGCCTGGAATNNSGTCGGATTGTAACAAGAAAAAGACCCGG (SEQ ID NO:156)
nprE-S135R	GAGCGGTTACGTCCATTGAACCSNNAAGAGGTGAGAAGAATGAACCGTCGC (SEQ ID NO:157)
nprE-G136R	CATGAGCGGTTACGTCCATTGASNNGGAAAGAGGTGAGAAGAATGAACCGTCGC (SEQ ID NO:158)
nprE-S137R	CATGAGCGGTTACGTCCATSNNACC GGAAAGAGGTGAGAA G (SEQ ID NO:159)
nprE-V140R	GTGTCAATTCATGAGCGGTSNNGTCCATTGAACCGGAAAGAGG (SEQ ID NO:160)
nprE-S197R	CTGTCCGTATTTGTGCGGATTGGATAASNNGCGGAGAGCCGGCTGGCTG (SEQ ID NO:161)
nprE-L198R	CTGTCCGTATTTGTGCGGATTGGASNNGTCGGAGAGCCGGCTGGCTG (SEQ ID NO:162)
nprE-S199R	GGCTGTCCGTATTTGTGCGGATTSNNTAAGCTGCGGAGAGCCGGCTGGCTG (SEQ ID NO:163)
nprE-L216R	GTGCGCCGGCATCAGTGTTCCGSNNGTTTTTGTAATTTTGAAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:164)
nprE-P217R	GTGCGCCGGCATCAGTGTTSNNAAGGTTTTTGTAATTTTGAAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:165)
nprE-N218R	GTAGTCGCCGGCATCAGTSNNGGAAAGTTTTTGTAATTTTGAAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:166)
nprE-T219R	CCGTAGTCGCCGGCATCSNNGTTCGGAAGTTTTTGTAATTTTGAAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:167)
nprE-D220R	CGCCGCCGTAGTCGCCGGCSNNAAGTTCGGAAGTTTTTGTAATTTTGAAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:168)
nprE-A221R	CACGCCGCCGTAGTCGCCSNNAATCAGTGTTCCGGAAGTTTTTGTAATTTTGAAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:169)
nprE-G222R	GTATGCACGCCGCCGTAGTCSNNGGCATCAGTGTTCCGGAAGG (SEQ ID NO:170)
nprE-Q286R	CAGCTTCTACGCTTGCAGCATCSNNAAGCCGTAAAGGTCCTCCG (SEQ ID NO:171)
nprE-A297R	CCGGTCTCTTTTCTTGTGTTACAATCCGACSNNAATCCAGGCAGCTTCTACGC (SEQ ID NO:172)

EJEMPLO 11

Identificación de homólogos de nprE

[0275] En este Ejemplo, se describen los experimentos realizados para identificar homólogos de npr. En concreto, en este Ejemplo, se realizaron experimentos para clonar homólogos de proteasa neutra (npr) de distintas especies *Bacillus* estrechamente relacionadas. Las distintas especies se escogieron con el objetivo de explorar la diversidad y las propiedades de las que se aíslan estas especies distintas.

[0276] Entre los diversos homólogos de npr explorados se incluyen:

npr de *B. caldolyticus* (P23384)

nprC de *B. cereus* (P05806)

npr E33L de *B. cereus* (AAY60523)

nprT de *B. stearothermophilus*

nprB de *B. subtilis*

nprE de *B. subtilis*

nprB de *B. thasringiensis* (AAK00602)

aur de *S. aureus* (P81177)

[0277] La Figura 3 proporciona un alineamiento de secuencias de dichos homólogos (SEQ ID NOS:173-181) y la Figura 4 (SEQ ID NOS:182-191) proporciona otro alineamiento de secuencias de diversos otros homólogos.

[0278] En estos experimentos, los materiales incluyeron:

ADN cromosómico de la cepa de *B. subtilis* 1168

[0279] Se sintetizaron los siguientes plásmidos de ADN a ADN2.0 con una optimización de codones de *B. subtilis*:

pJ4:G01905 (nprB de *B. thuringiensis*) (véase Figura 6)

pJ4:G01906 (npr E33L de *B. cereus*) (véase Figura 7)

pJ4:G01907 (nprC de *B. cereus*) (véase Figura 8)

pJ4:G01908 (npr de *B. caldolyticus*) (véase Figura 9)

pJ4:G01909 (aur de *S. aureus*) (véase Figura 10)

pJ4:G01938 (nprT de *S. stearothermophilus*) (véase Figura 11)

vector pJHT (véase Figura 12)

vector pAC (véase Figura 13)

Termociclador MJ Research PTC-200 Peltier (Bio-Rad Laboratories)

Cebadores (Operon Inc)

ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS (Stratagene)

Endonucleasas de restricción (Roche)

Células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes (Invitrogen)

Células de *B. subtilis* competentes (($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoII E$, $degU Hy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxyIA-comK)$)

Tabla 11. Cebadores	
Nombre cebador	Secuencia de cebadores y SEQ ID NO:
EL-689	CGTCTTCAACAATTGTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:196)
EL-693	CAGACAATTTCTTACCTAAACCCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATT C (SEQ ID NO:197)
EL-694	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGGGTTTAGGTAAGAAATTGT CTG (SEQ ID NO:198)
EL-695	GCTTATGGATCCCGTCGTTTCAGCTGAGAGAG (SEQ ID NO:199)
EL-696	GATGTCTTGGTCAAGTTGCGCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTC (SEQ ID NO:200)
EL-697	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGC GCAACTTGACCAAGACAT C (SEQ ID NO:201)
EL-698	GCCGGTTTTTTATGTAAGCTTATAGAATGCCGACAGCCTCATACG (SEQ ID NO:202)
EL-699	CGTATGAGGCTGTCGGCATTCTATAAGCTTACATAAAAAACCGGCCTTGG (SEQ ID NO:203)
EL-700	AATGGTGCATGCAAGGAGATGGCG (SEQ ID NO:204)
EL-755	CGTCTTCAAGAATTCTCCATTTCTTCTGC (SEQ ID NO:205)
EL-733	GCACCCAACATTGCACGTTTATTCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAAT TC (SEQ ID NO:206)
EL-734	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAATAAACGTGCAATGTTGG GTGC (SEQ ID NO:207)
EL-735	GCTTATAAGCTTAATATACTCCAACCGCGTTG (SEQ ID NO:208)
EL-739	CCAGCATAGCGCGTTTGTTCACCTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTC (SEQ ID NO:209)
EL-740	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAACAAACGCGCTATGCTGG (SEQ ID NO:210)
EL-741	GCTTATAAGCTTAATAGACACCCACGGCATTAAACGCC (SEQ ID NO:211)
EL-742	CAGGACAAGAGCTAAGGACTTTTTTTTCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAA AAAATTC (SEQ ID NO:212)
EL-743	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAAAAAAGTCCTTAGCTC TTGTCCTG (SEQ ID NO:213)
EL-744	GCTTATAAGCTTAATTAATGCCGACGGCAC (SEQ ID NO:214)

A. Clonación de *nprE* de *B. subtilis*

- 5 **[0280]** Para construir el plásmido *nprE* de *B. subtilis*, se prepararon por separado el fragmento de promotor de *aprE* amplificado (a partir del vector pJHT) y el fragmento de gen *nprE* de *B. subtilis* con terminador (a partir de la cepa de *B. subtilis* I168). La Figura 15 proporciona un esquema que ilustra la amplificación de los fragmentos de ADN individuales.
- 10 **[0281]** Se utilizó la reacción por PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento (SOE) para unir los dos fragmentos de ADN separados. En esta reacción, se combinaron los siguientes reactivos: 1 ul de fragmento de ADN de promotor de *aprE*, 1 ul de fragmento de gen *nprE* de *B. subtilis* + terminador, 1 ul de cebador EL-689 (25 uM), 1 ul de cebador EL-695 (25 uM), 5 ul de 10x tampón de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS, 1 ul de dNTP (10 mM), 1 ul de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS y 39 ul de agua destilada en autoclave para proporcionar un volumen de reacción total de 50 ul. Los ciclos de PCR fueron: 95 °C durante 2 minutos (solo primer ciclo), seguido de 28 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 0:45 segundos.
- 15

[0282] El fragmento de fusión por PCR de promotor de aprE-gen nprE de *B. subtilis* + terminador se digirió con las endonucleasas de restricción *MfeI* y *Bam*HI. El vector pJHT se digirió con las endonucleasas de restricción *Eco*RI y *Bam*HI. El fragmento de ADN de promotor de aprE- gen nprE de *B. subtilis* + terminador digerido con endonucleasas de restricción se ligó a continuación con el vector pJHT digerido con endonucleasas de restricción. La mezcla de ligamiento se transformó entonces en células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes para su selección sobre LA + 50 ppm de carbenicilina. Tras la identificación de plásmidos que contuvieran la secuencia de construcción de ADN correcta para el plásmido pEL501 (véase Figura 16), se transformaron en células de *B. subtilis* competentes para su integración en el locus del promotor de aprE. Los transformantes se seleccionaron por la actividad de proteasa (es decir, aclaramiento sobre leche desnatada) sobre placas de LA + 5 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. Las cepas amplificadas se trasladaron entonces a placas de LA + 25 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. Las cepas se trasladaron entonces a placas de LA + 25 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 % para su amplificación.

B. Clonación de nprB de *B. subtilis*

[0283] Para construir el plásmido nprB de *B. subtilis*, se prepararon por separado el fragmento de promotor de aprE amplificado (a partir del vector pJHT), el fragmento de gen nprB de *B. subtilis* (a partir de la cepa de *B. subtilis* 1168) y el fragmento terminador (a partir del vector pJHT). La Figura 17 proporciona un diagrama esquemático de la amplificación de los fragmentos de ADN individuales.

[0284] Se utilizó la reacción por PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento (SOE) para unir los tres fragmentos de ADN separados. En esta reacción, se combinaron los siguientes reactivos: 1 ul de fragmento de ADN de promotor de aprE, 1 ul de fragmento de gen nprB de *B. subtilis* + terminador, 1 ul de fragmento de ADN terminador, 1 ul de cebador EL-689 (25 uM), 1 ul de cebador EL-700 (25 uM), 5 ul de 10x tampón de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS, 1 ul de dNTP (10 mM), 1 ul de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS y 38 ul de agua destilada en autoclave para proporcionar un volumen de reacción total de 50 ul. Los ciclos de PCR fueron: 95 °C durante 2 minutos (solo primer ciclo), seguido de 28 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 0:45 segundos.

[0285] El fragmento de fusión por PCR de promotor de aprE-gen nprB de *B. subtilis* + terminador se digirió con las endonucleasas de restricción *MfeI* y *SphI*. El vector pJHT se digirió con las endonucleasas de restricción *Eco*RI y *SphI*. El fragmento de ADN de promotor de aprE- gen nprB de *B. subtilis* + terminador digerido con endonucleasas de restricción se ligó a continuación con el vector pJHT digerido con endonucleasas de restricción. La mezcla de ligamiento se transformó entonces en células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes para su selección sobre LA + 50 ppm de carbenicilina. Tras la identificación de plásmidos que contuvieran la secuencia de construcción de ADN correcta para el plásmido pEL508 (véase Figura 18), se transformaron en células de *B. subtilis* competentes para su integración en el locus del promotor de aprE. Los transformantes se seleccionaron por la actividad de proteasa (es decir, aclaramiento sobre leche desnatada) sobre placas de LA + 5 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. Las cepas amplificadas se trasladaron entonces a placas de LA + 25 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. Las cepas se trasladaron entonces a placas de LA + 25 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 % para su amplificación.

C. Clonación de nprT de *B. stearothermophilus*

[0286] Para construir el plásmido nprT de *B. stearothermophilus*, se prepararon por separado el fragmento de promotor de aprE amplificado (a partir del vector pJHT) y el fragmento de nprT de *B. stearothermophilus* (a partir del plásmido pJ4:G01938). La Figura 19 proporciona un diagrama esquemático de la amplificación de los fragmentos de ADN individuales.

[0287] Se utilizó la reacción por PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento (SOE) para unir los 2 fragmentos de ADN separados. En esta reacción, se combinaron los siguientes reactivos: 1 ul de fragmento de ADN de promotor de aprE, 1 ul de fragmento de gen nprT de *B. stearothermophilus*, 1 ul de cebador EL-755 (25 uM), 1 ul de cebador EL-735 (25 uM), 5 ul de 10x tampón de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS, 1 ul de dNTP (10 mM), 1 ul de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS y 39 ul de agua destilada en autoclave para proporcionar un volumen de reacción total de 50 ul. Los ciclos de PCR fueron: 95 °C durante 2 minutos (solo primer ciclo), seguido de 28 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 0:45 segundos.

[0288] El fragmento de fusión por PCR de promotor de aprE-gen nprT de *B. stearothermophilus* + terminador se digirió con las endonucleasas de restricción *Eco*RI y *Hind*III. El vector pAC se digirió con las endonucleasas de restricción *Eco*RI y *Hind*III. El fragmento de ADN de promotor de aprE- nprT de *B. stearothermophilus* digerido con endonucleasas de restricción se ligó a continuación con el vector pAC digerido con endonucleasas de restricción. Luego se usó la amplificación por círculo rodante TempliPhi para generar grandes cantidades de la molécula de ADN ligada de promotor de aprE- nprT de *B. stearothermophilus* pAC, valiéndose del protocolo del fabricante (es decir, 1 ul de reacción de ligamiento de promotor de aprE - nprT de *B. stearothermophilus* pAC,

5 ul de tampón de muestra TempliPhi, 5 ul de tampón de reacción TempliPhi y 0.2 ul de mezcla enzimática TempliPhi, para una reacción total de ~11 ul; incubación a 30 °C durante 3 horas). La reacción TempliPhi se transformó entonces directamente en células de *B. subtilis* competentes para su integración en el locus del promotor de aprE, generando de este modo la cepa de *Bacillus* EL560, confirmada por el análisis de secuenciación del ADN (véase Figura 20). Los transformantes se seleccionaron por la actividad de proteasa (es decir, aclaramiento sobre leche desnatada) sobre placas de LA + 5 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. Las cepas amplificadas se trasladaron entonces a placas de LA + 25 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. Las cepas se trasladaron entonces a placas de LA + 25 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 % para su amplificación.

D. Clonación de npr de *B. caldolyticus*

[0289] Para construir el plásmido npr de *B. caldolyticus*, se prepararon por separado el fragmento de promotor de aprE amplificado (a partir del vector pJHT) y el fragmento de npr de *B. caldolyticus* (a partir del plásmido pJ4:G01908). La Figura 21 proporciona un diagrama esquemático de la amplificación de los fragmentos de ADN individuales.

[0290] Se utilizó la reacción por PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento (SOE) para unir los 2 fragmentos de ADN separados. En esta reacción, se combinaron los siguientes reactivos: 1 ul de fragmento de ADN de promotor de aprE, 1 ul de fragmento de gen npr de *B. caldolyticus*, 1 ul de cebador EL-755 (25 uM), 1 ul de cebador EL-741 (25 uM), 5 ul de 10x tampón de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS, 1 ul de dNTP (10 mM), 1 ul de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS y 39 ul de agua destilada en autoclave para proporcionar un volumen de reacción total de 50 ul. Los ciclos de PCR fueron: 95 °C durante 2 minutos (solo primer ciclo), seguido de 28 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 0:45 segundos.

[0291] El fragmento de fusión por PCR de promotor de aprE-gen npr de *B. caldolyticus* + terminador se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El vector pAC se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El fragmento de ADN de promotor de aprE- npr de *B. caldolyticus* digerido con endonucleasas de restricción se ligó a continuación con el vector pAC digerido con endonucleasas de restricción. Luego se usó la amplificación por círculo rodante TempliPhi para generar grandes cantidades de la molécula de ADN ligada de promotor de aprE- npr de *B. caldolyticus* pAC, valiéndose del protocolo del fabricante (es decir, 1 ul de reacción de ligamiento de promotor de aprE – npr de *B. caldolyticus* pAC, 5 ul de tampón de muestra TempliPhi, 5 ul de tampón de reacción TempliPhi y 0.2 ul de mezcla enzimática TempliPhi, para una reacción total de ~11 ul; incubación a 30 °C durante 3 horas). La reacción TempliPhi se transformó entonces directamente en células de *B. subtilis* competentes para su integración en el locus del promotor de aprE, generando de este modo la cepa de *Bacillus* EL561 (véase Figura 22), confirmada por el análisis de secuenciación del ADN. Los transformantes se seleccionaron por la actividad de proteasa (es decir, aclaramiento sobre leche desnatada) sobre placas de LA + 5 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. Las cepas amplificadas se trasladaron entonces a placas de LA + 25 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. Las cepas se trasladaron entonces a placas de LA + 25 ppm de cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 % para su amplificación.

E. Clonación de nprB de *B. thuringiensis*

[0292] Para construir el plásmido nprB de *B. thuringiensis*, se prepararon por separado el fragmento de promotor de aprE amplificado (a partir del vector pJHT) y el fragmento de nprB de *B. thuringiensis* (a partir del plásmido pJ4:G01905). La Figura 23 proporciona un esquema que muestra la amplificación de los fragmentos de ADN individuales.

[0293] Se utilizó la reacción por PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento (SOE) para unir los 2 fragmentos de ADN separados. En esta reacción, se combinaron los siguientes reactivos: 1 ul de fragmento de ADN de promotor de aprE, 1 ul de fragmento de gen nprB de *B. thuringiensis*, 1 ul de cebador EL-755 (25 uM), 1 ul de cebador EL-744 (25 uM), 5 ul de 10x tampón de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS, 1 ul de dNTP (10 mM), 1 ul de ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS y 39 ul de agua destilada en autoclave para proporcionar un volumen de reacción total de 50 ul. Los ciclos de PCR fueron: 95 °C durante 2 minutos (solo primer ciclo), seguido de 28 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 0:45 segundos.

[0294] El fragmento de fusión por PCR de promotor de aprE-gen nprB de *B. thuringiensis* + terminador se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El vector pAC se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El fragmento de ADN de promotor de aprE- nprB de *B. thuringiensis* digerido con endonucleasas de restricción se ligó a continuación con el vector pAC digerido con endonucleasas de restricción. La mezcla de ligamiento se transformó entonces en células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes. Tras la identificación de plásmidos que contuvieran la secuencia de construcción de ADN correcta para el plásmido pEL568, se transformaron en células de *B. subtilis* competentes. Los transformantes se seleccionaron por la actividad de proteasa (es decir, aclaramiento sobre leche desnatada) sobre placas de LA + 5 ppm de

cloranfenicol + leche desnatada al 1.6 %. La preparación de plásmido de ADN muestra que el plásmido pEL568 es estable en *B. subtilis* y no se integra en el locus del promotor de aprE. La Figura 24 proporciona un mapa del plásmido pEL568.

5 E. Modelado por homología

[0295] En otras formas de realización adicionales, se proporciona un modelo por homología del dominio maduro de NprE a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*. En dichos experimentos, se analizó la secuencia de proteínas del dominio maduro de la secuencia de NprE (SEQ ID NO:192) en el programa BlastP (NCBI). Este programa hace coincidir la secuencia con otras secuencias conocidas de diversa identidad secuencial. A partir de los datos de salida, se identificaron secuencias para las que se conocen estructuras cristalinas de rayos X. Entre esas secuencias se incluían Npr de *S. aureus* (pdb id 1BQB) Npr de *P. aeruginosa* (pdb id1EZM), termolisina de *B. thermolyticus* (pdb id 1KEI) y Npr de *B. cereus* (pdb id 1NPC). La Figura 5 proporciona un alineamiento de secuencias de las diversas secuencias analizadas (SEQ ID NOS:192-195).

[0296] La secuencia de la Npr de *B. cereus* que se observó que era la más idéntica a NprE. La termolisina de *B. thermolyticus* (pdb id 1KEI) se excluyó de las etapas posteriores, ya que es muy similar a Npr de *B. cereus*. Se preparó entonces un modelo por homología del modo detallado a continuación, y todos los cálculos se realizaron por medio del programa MOE (Chemical Computing).

[0297] En primer lugar, se alinearon las secuencias Npr de *S. aureus* (pdb id 1BQB; SEQ ID NO:193) Npr de *P. aeruginosa* (pdb id1EZM)(SEQ ID NO:194) y Npr de *B. cereus* (pdb id 1NPC)(SEQ ID NO:195) por medio de una estructura conocida para obtener el alineamiento de secuencias más exacto (es decir, se produjo un alineamiento de secuencias basado en la estructura). A continuación, la secuencia madura de NprE se alineó con respecto a este alineamiento de secuencias basado en la estructura. Después, se produjo un modelo por homología inicial de NprE valiéndose de la estructura de Npr de *B. cereus* (pdb id 1NPC) como plantilla y mediante el alineamiento de secuencias de NprE con Npr de *B. cereus* que se produjo anteriormente. A partir de la inspección de dicho alineamiento, se hizo patente que mientras que Npr de *B. cereus* contiene cuatro sitios de unión a iones de Ca^{2+} , NprE contiene únicamente dos sitios de unión a iones de Ca^{2+} .

[0298] Por último, después de que se hubiera construido el modelo por homología inicial, los iones metálicos (es decir, Zn^{2+} y dos Ca^{2+}) se arreglaron computacionalmente, así como sus ligandos proteicos correspondientes. El resto de la estructura del modelo se redujo al mínimo computacionalmente por medio del conjunto de parámetros CHARMM22, lo que dio lugar al modelo por homología final.

EJEMPLO 12

Pruebas de rendimiento de lavado

[0299] En este Ejemplo, se describen los experimentos realizados para determinar el rendimiento de lavado de la metaloproteasa de la presente invención. Todas las pruebas de rendimiento de lavado se llevaron a cabo en condiciones de lavado estadounidenses, tal y como se indica a continuación.

Pruebas de rendimiento de lavado de ropa

[0300]

Equipo:	Modelo de banco de trabajo de 6 recipientes Terg-O-Tometer (US Testing)
Temperatura:	15 °C / 60 °F
Tiempo de lavado:	12 minutos
Agitación:	100 rpm
Tiempo de aclarado:	3 minutos
Dureza del agua:	6 granos por galón / 105 ppm como CaCO_3 (3/1 Ca^{+2} / Mg^{+2})
Concentración de espuma:	1.6 g/l base de detergente líquido TIDE@ 2005
Dosis de enzimas:	0.00 - 0.55 - 2.75 - 5.50 mg de proteína activa/l de solución de lavado
Muestras:	EMPA 116 fijada, fijada a 20 °C: sangre, leche, tinta sobre algodón (10 x 7.5 cm)

		EMPA 116 sin fijar: sangre, leche, tinta sobre algodón (10 x 7.5 cm)
		Hierba Equest: hierba de suciedad media frotada sobre algodón (10 x 7.5 cm)
		CFT C-10: pigmento, aceite, leche sobre algodón (10 x 7.5 cm)
		EMPA 221: algodón sin ensuciar usado como lastre (10 x 10 cm)
5		Se colocaron 6 EMPA 116 fijadas + 2 EMPA 221 en un recipiente
		Se colocaron 6 EMPA 116 sin fijar + 2 EMPA 221 en un recipiente
		Se colocaron 6 hierba Equest + 2 EMPA 221 en un recipiente
		Se colocaron 6 CFT C-10 + 2 EMPA 221 en un recipiente
10	Condiciones de secado:	Secadora, las manchas de hierba se secaron al aire, tapadas con prendas oscuras. El resto de manchas se plancharon.
	Medición de muestras:	Tristimulus Minolta Meter CR-300 con ecuación L (L*a*b), D65 Std. Illuminate, sobre fondo blanco. Expresada en % de eliminación de suciedad delta
		3 lecturas por muestra (antes y después del lavado)
15	$\% \text{ de eliminación de manchas} = (\text{valor L tras el lavado} - \text{valor L antes del lavado}) / (\text{Lo algodón blanco} - \text{valor L antes del lavado}) \times 100 \%$	
	[0301] Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado.	
20	[0302] Las proteasas fueron sometidas a prueba en una prueba de lavado especialmente desarrollada para este fin, valiéndose de tres muestras de algodón distintas, ensuciadas con:	
	(a) leche, sangre y tinta (10.0 x 7.5 cm; EMPA), designada con los números 116 sin fijar y fijada (las manchas se fijaron a 20 °C);	
	(b) hierba de suciedad media (10.0 x 7.5 cm; Equest); y	
	(c) pigmento, aceite y leche (10.0 x 7.5 cm designada con los números C-10 CFT).	
25	[0303] Estos experimentos se describen con mayor detalle a continuación. Las pruebas de lavado se llevaron a cabo en un modelo de banco de trabajo Terg-O-Tometer (US Testing), equipado con seis recipientes de ensayo de acero inoxidable. Cada uno de los recipientes de ensayo de acero inoxidable contenía 1.6 g de base de detergente líquido TIDE® 2005, disueltos en 1000 ml de agua de 105 ppm/6 granos por galón, y a cada uno de ellos se le cargó seis de las mismas muestras de algodón ensuciadas y dos muestras de algodón de lastre adicionales (EMPA 221). Se añadió una proteasa seleccionada (por ejemplo, metaloproteasa neutra u otra proteasa) a cada recipiente en una concentración de 0.00 a 5.50 mg de proteína activa por litro de espuma.	
30		
35	[0304] Las pruebas se efectuaron durante 12 minutos a 15 °C/60 °F, con una agitación de 100 rpm. Tras el lavado, las muestras se enjuagaron durante 3 minutos con agua del grifo fría y se colocaron en una secadora. Las muestras de hierba se secaron al aire y se taparon con prendas oscuras para limitar la sensibilidad a la luz de las manchas de hierba. El resto de muestras se plancharon. Todos los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado.	
40	[0305] La reflectancia de las muestras sometidas a prueba se midió con un Tristimulus Minolta Meter CR-300 por medio de la ecuación L (L*a*b). Los valores de rendimiento de lavado se calcularon por medio de la siguiente relación:	
45	$\% \text{ de eliminación de manchas} = (\text{valor L tras el lavado} - \text{valor L antes del lavado}) / (\text{Lo algodón blanco} - \text{valor L antes del lavado}) \times 100 \%$	
	[0306] En la Figura 26 se muestran los resultados del ensayo de Terg-O-Tometer (TOM) para MULTIFECT® purificada, y se comparan con los de la subtilisina (BPN' Y217L), una proteasa serínica alcalina. El TOM proporcionó un medio completamente operativo y válido para distinguir entre los distintos rendimientos de lavado de diversas proteasas (por ejemplo, proteasas serínicas, metaloproteasa neutra y variantes de estas). Las	

pruebas con TOM se llevaron a cabo sobre una superficie de BMI y hierba de suciedad media Equest con detergente de base TIDE® 2005.

[0307] Como se indicó en la Figura 26, se puso de manifiesto que la metaloproteasa neutra purificada tenía claramente un mejor rendimiento en la prueba de lavado que la proteasa serínica (BPN' Y217L). En concreto, se necesitaron 2.75 ppm de metaloproteasa neutra purificada para mostrar una eliminación de suciedad delta de ~ 10 % en comparación con los solo 0.55 ppm de la proteasa serínica (BPN' Y217L) en la mancha de hierba Equest. El rendimiento de lavado de la metaloproteasa neutral también se sometió a prueba a baja temperatura y se observó que tenía un muy buen rendimiento en la tela manchada de suciedad media Equest. Se obtuvieron resultados similares con la proteasa neutra MULTIFECT® purificada disponible comercialmente, así como con la nprE recombinante producida del modo descrito anteriormente.

EJEMPLO 13

Rendimiento de variantes de NprE en ensayo de rendimiento BMI-TIDE® 2X

[0308] En este Ejemplo se describen los experimentos realizados para evaluar el rendimiento de diversas variantes de nprE en el ensayo de BMI expuesto anteriormente. Se utilizaron los métodos ofrecidos antes del Ejemplo 1 (véase «Ensayo de micromuestras para probar el rendimiento de la proteasa»). En las siguientes tablas se proporcionan los resultados de variantes de sustitución múltiple con índices de rendimiento mayores que uno ($PI > 1$) y las que presentan índices de rendimiento menores que uno ($PI < 1$)

[0309] En la Tabla 13.1 se proporcionan los datos obtenidos de variantes de sustitución simple en el ensayo de rendimiento BMI-TIDE® 2X. La Tabla proporciona índices de rendimiento, que se calcularon del modo descrito anteriormente para las variantes, que muestran una mejora del rendimiento en comparación con la enzima natural. Dichas variantes, que presentan un índice de rendimiento mayor que 1, presentan una mejora del rendimiento.

[0310] En la Tabla 13.2 se proporcionan los datos obtenidos de variantes de sustitución múltiple seleccionadas en el ensayo de rendimiento BMI-TIDE® 2X. La Tabla proporciona índices de rendimiento, que se calcularon del modo descrito anteriormente para las variantes, que muestran una mejora del rendimiento en comparación con la enzima natural. Dichas variantes, que presentan un índice de rendimiento mayor que 1, presentan una mejora del rendimiento.

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [Índ. rend.]
T004H	1.07
T004I	1.25
T004K	1.62
T004L	1.01
T004M	1.05
T004N	1.03
T004P	1.18
T004R	1.65
T004V	1.18
T004W	1.21
T004Y	1.32
G012I	1.24
G012K	1.64
G012L	1.25
G012M	1.11
G012Q	1.09
G012R	1.54
G012T	1.38
G012V	1.18
G012W	1.46
T014F	1.17
T014G	1.17
T014I	1.28
T014K	1.53
T014L	1.19
T014M	1.11
T014P	1.04
T014Q	1.24
T014R	1.48
T014S	1.07
T014V	1.14
T014W	1.17
T014Y	1.11
E022K	1.79
S023F	1.30
S023I	1.20
S023K	1.67

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [Índ. rend.]
S023L	1.27
S023M	1.04
S023P	1.23
S023Q	1.22
S023R	1.75
S023V	1.09
S023W	1.41
S023Y	1.06
G024F	1.26
G024H	1.33
G024I	1.24
G024K	1.70
G024L	1.23
G024M	1.14
G024N	1.28
G024P	1.18
G024R	1.67
G024T	1.07
G024V	1.12
G024W	1.42
G024Y	1.12
K033H	1.01
Q045F	1.25
Q045H	1.25
Q045I	1.40
Q045K	1.64
Q045L	1.24
Q045N	1.07
Q045R	1.68
Q045T	1.09
Q045W	1.60
N046A	1.06
N046F	1.11
N046G	1.07
N046H	1.32
N046K	1.61
N046L	1.14

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [Índ. rend.]
N046M	1.13
N046Q	1.22
N046R	1.19
N046S	1.02
N046T	1.20
N046W	1.24
N046Y	1.21
R047K	1.15
Y049F	1.06
Y049I	1.08
Y049K	1.10
Y049L	1.06
Y049R	1.54
Y049W	1.34
N050F	1.38
N050H	1.13
N050I	1.36
N050K	1.65
N050L	1.35
N050M	1.05
N050P	1.12
N050Q	1.16
N050R	1.81
N050W	1.46
N050Y	1.27
T054F	1.16
T054G	1.12
T054H	1.17
T054I	1.34
T054K	1.47
T054L	1.26
T054N	1.25
T054Q	1.23
T054R	1.46
T054S	1.03
T054V	1.11
T054W	1.22

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [Índ. rend.]
T054Y	1.08
S058H	1.03
S058N	1.12
S058Q	1.08
T059G	1.11
T059H	1.32
T059I	1.43
T059K	1.60
T059L	1.31
T059M	1.10
T059N	1.16
T059P	1.19
T059Q	1.31
T059R	1.56
T059V	1.13
T059W	1.32
T060F	1.07
T060I	1.09
T060K	1.49
T060L	1.13
T060N	1.07
T060Q	1.10
T060R	1.42
T060V	1.13
T060W	1.23
T060Y	1.07
T065F	1.06
T065H	1.07
T065I	1.12
T065K	1.32
T065L	1.10
T065M	1.09
T065P	1.11
T065Q	1.01
T065R	1.28
T065V	1.15
T065Y	1.09

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [Índ. rend.]
S066F	1.05
S066H	1.06
S066I	1.24
S066K	1.44
S066L	1.09
S066N	1.00
S066Q	1.12
S066R	1.47
S066V	1.19
S066W	1.21
S066Y	1.06
Q087H	1.06
Q087I	1.17
Q087K	1.30
Q087L	1.07
Q087M	1.00
Q087N	1.06
Q087R	1.35
Q087T	1.08
Q087V	1.04
Q087W	1.15
N090F	1.05
N090H	1.09
N090K	1.37
N090L	1.18
N090R	1.37
N096G	1.00
N096H	1.04
N096K	1.54
N096R	1.06
K097H	1.03
K097Q	1.05
K097W	1.02
K100R	1.26
R110K	1.05
D119E	1.05
D119H	1.16

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [Índ. rend.]
D119I	1.09
D119L	1.21
D119Q	1.17
D119R	1.14
D119S	1.10
D119T	1.23
D119V	1.24
D119W	1.09
G128F	1.10
G128H	1.27
G128K	1.90
G128L	1.20
G128M	1.11
G128N	1.23
G128Q	1.22
G128R	1.94
G128W	1.48
G128Y	1.42
S129A	1.12
S129F	1.11
S129G	1.03
S129H	1.17
S129K	1.33
S129L	1.01
S129R	1.37
S129T	1.04
S129V	1.01
S129W	1.28
S129Y	1.25
F130I	1.03
F130K	1.26
F130R	1.37
F130Y	1.31
S135P	1.03
M138K	1.36
M138Q	1.03
M138V	1.10

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [índ. rend.]
V140C	1.03
Q151I	1.02
E152A	1.14
E152C	1.15
E152D	1.14
E152F	1.09
E152G	1.03
E152H	1.15
E152L	1.15
E152M	1.12
E152N	1.11
E152R	1.19
E152S	1.02
E152W	1.06
N155D	1.13
N155K	1.05
N155R	1.14
T179A	1.03
T179F	1.15
T179H	1.20
T179I	1.21
T179K	1.62
T179L	1.20
T179M	1.12
T179N	1.04
T179P	1.04
T179Q	1.23
T179R	1.49
T179S	1.02
T179V	1.12
T179W	1.05
T179Y	1.07
V190H	1.02
V190I	1.16
V190K	1.75
V190Q	1.23
V190R	1.67

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [índ. rend.]
S191F	1.18
S191G	1.03
S191H	1.29
S191I	1.12
S191K	1.58
S191L	1.07
S191N	1.13
S191Q	1.13
S191R	1.74
S191W	1.16
L198M	1.19
L198V	1.05
S199F	1.10
S199I	1.08
S199K	1.64
S199L	1.15
S199N	1.14
S199Q	1.14
S199R	1.68
S199V	1.06
Y204H	1.03
G205F	1.13
G205H	1.61
G205L	1.14
G205M	1.14
G205N	1.39
G205R	2.07
G205S	1.25
G205Y	1.21
K211R	1.23
K214R	1.19
L216F	1.13
L216H	1.05
L216Q	1.05
L216R	1.64
L216Y	1.02
N218K	1.57

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [índ. rend.]
N218P	1.27
D220E	1.05
D220H	1.00
D220N	1.04
D220P	1.05
A221F	1.13
A221I	1.14
A221K	1.49
A221L	1.05
A221M	1.01
A221N	1.05
A221V	1.14
A221Y	1.17
G222H	1.01
G222N	1.01
G222R	1.04
Y224F	1.05
Y224H	1.29
Y224N	1.23
Y224R	1.12
T243G	1.13
T243H	1.48
T243I	1.06
T243K	1.87
T243L	1.11
T243Q	1.36
T243R	1.62
T243W	1.25
T243Y	1.14
V260A	1.69
V260D	1.59
V260E	1.17
V260G	2.00
V260H	1.36
V260I	2.09
V260K	1.45
V260L	1.18

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [índ. rend.]
V260M	1.41
V260P	1.45
V260Q	1.73
V260R	1.47
V260S	1.59
V260T	1.66
V260W	1.83
V260Y	1.20
T263H	1.06
S265K	1.30
S265N	1.04
S265R	1.28
S265W	1.00
A273I	1.19
A273K	1.47
A273L	1.14
A273N	1.10
A273Q	1.00
A273R	1.78
A273Y	1.07
L282F	1.09
L282G	1.14
L282H	1.17
L282I	1.23
L282K	1.67
L282M	1.01
L282N	1.08
L282Q	1.17
L282R	1.41
L282V	1.22
S285K	1.20
S285R	1.23
Q286K	1.22
Q286R	1.14
A289K	1.23
A289R	1.32
A293R	1.36

Tabla 13.1 Resultados ensayo rendimiento para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide 2X [índ. rend.]
N296K	1.28
N296R	1.42
A297K	1.56
A297N	1.02
A297Q	1.02
A297R	1.50
G299N	1.02

Tabla 13.2 Resultados ensayo rendimiento BMI para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Det. líquido BMI Tide® 2X [Índ. rend.]
S023W-G024M	2.36
T004V-S023W-G024W	2.25
S023W-G024Y-A288V	2.14
T004L-S023W-G024Y	2.09
N046Q-N050F-T054L	2.03
N050Y-T059R-S129Q	1.97
S023W-G024W	1.97
A273H-S285P-E292G	1.94
S023Y-G024Y	1.93
S023Y-G024W	1.92
T004S-S023Y-G024W	1.91
N046Q-T054K	1.90
S023W-G024Y	1.90
T004V-S023W	1.89
T059K-S066N	1.88
N046Q-N050W-T054H-T153A	1.87
T004V-S023W-G024Y	1.85
L282M-Q286P-A289R	1.83
N046Q-R047K-N050Y-T054K	1.82
L044Q-T263W-S285R	1.81
T004L-S023W-G024W	1.79
R047K-N050F-T054K	1.78
A273H-S285R	1.78
N050Y-T059K-S066Q	1.78
T054K-Q192K	1.76
N046Q-N050W	1.75
L282M-Q286K	1.75
T059K-S066Q	1.74
T004S-S023W	1.74
L282M-Q286R-A289R-K11N	1.73
L282M-A289R	1.73
N046Q-N050W-T054H	1.73
T059K-S129Q	1.72

Tabla 13.2 Resultados ensayo rendimiento BMI para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Líquido BMI Tide® 2X
T004S-S023N-G024Y-F210L	1.71
T004V-S023W-G024M-A289V	1.70
L282M-Q286K-A289R-S132T	1.70
N050W-T054H	1.70
L282M-Q286R	1.69
L282F-Q286K-A289R	1.69
T059R-S066Q	1.68
R047K-N050W-T054H	1.68
S265P-L282M-Q286K-A289R	1.66
L282M-Q286R-T229S	1.66
L282F-Q286K	1.66
T263W-S285R	1.65
S265P-L282M-Q286K	1.65
T263H-A273H-S285R	1.65
T059R-S129V	1.64
S032T-T263H-A273H-S285R	1.64
T059R-S066Q-S129Q	1.64
T004S-G024W	1.64
T004V-S023W-G024M	1.64
T059K-S066Q-S129Q	1.63
L282M-Q286K-A289R-I253V	1.63
T004V-S023Y-G024W	1.63
T059R-S066N-S129Q	1.62
N050F-T054L	1.62
T004S-S023N-G024W	1.62
T059R-S066N	1.62
T059R-S066N-S129V	1.60
Q286R-A289R	1.60
N046Q-R047K-N050F-T054K	1.60
S265P-L282M-Q286R-A289R	1.57

Tabla 13.2 Resultados ensayo rendimiento BMI para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Líquido BMI Tide® 2X
S265P-L282M-Q286P-A289R	1.68
Q062K-S066Q-S129I	1.59
S023N-G024W	1.59
N046Q-R047K-N050W-T054H	1.58
R047K-T054K	1.58
T004L-G024W	1.58
T014M-T059R-S129V	1.58
T059R-S066Q-N092S-S129I	1.58
R047K-N050W-T054K	1.58
T004V-G024W	1.58
N047K-N050F-T054K	1.57
S265P-L282F-Q286K-N061Y	1.57
L282F-Q286K-E159V	1.57
T004V-S023Y-G024M	1.57
S265P-L282F-A289R-T065S	1.55
T059K-F063L-S066N-S129V	1.55
T004L-S023W	1.55
N050F-T054H	1.55
T059R-S066Q-S129V	1.54
V190I-D220E-S265W-L282F	1.54
T004S-S023Y-G024M	1.53
T004L-S023N-G024Y	1.53
T059K-S066N-S129I	1.53
T059R-S066N-S129I	1.53
L282M-Q286R-A289R-P162S	1.52
N046Q-N050F-T179N	1.52
T059K-Y082C-S129V	1.52
T059K-S129I	1.52
N050Y-T054K	1.51
T059K-S066Q-V102A-	1.51

Tabla 13.2 Resultados ensayo rendimiento BMI para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Líquido BMI Tide® 2X
S129Q	
T059R-S066Q-S129I	1.51
T059W-S066N-S129V-S290R	1.51
T059R-S129I	1.50
T059K-S066Q-S129I	1.50
T059K-S066Q-S129V	1.50
S265P-L282M-Q286R-A289R-T202S-K203N	1.49
T004V-S023N-G024W	1.49
S265P-Q286K	1.49
S265P-L282F-A289R	1.49
D220P-S265W	1.49
L055F-T059W-S129V	1.49
T059R-S129Q-S191R	1.49
N050W-T054K	1.49
T004S-S023W-G024M	1.49
R047K-N050F-T054H	1.48
T059K-S066N-K088E	1.48
T059K-S066Q-S129I-V291L	1.48
L282M-Q286R-A289R	1.48
T059R-S066N-F085S-S129I	1.47
L282F-Q286P-A289R	1.45
L282F-Q286R-A289R	1.47
G099D-S265P-L282F-Q286K-A289R	1.46
N046Q-N050F	1.46
N050Y-T059W-S066N-S129V	1.45
T009I-D220P-S265N	1.45
V190F-D220P-S265W	1.45
N157Y-T263W-A273H-S285R	1.44
T263W-A273H-S285R	1.44
T263W-S285W	1.44
T004V-S023Y	1.43

Tabla 13.2 Resultados ensayo rendimiento BMI para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Líquido BMI Tide® 2X
N046Q-R047K-N050W	1.42
N050W-T054L	1.42
N200Y-S265P-L282F-Q286P-A289R	1.42
T059R-S066Q-P264Q	1.42
T004V-G024Y	1.40
T004L-G024Y	1.40
N050Y-S191I	1.39
N050Y-T054L	1.39
T004L-S023W-G024Y-N155K	1.39
F169I-L282F-Q286R-A289R	1.39
L282M-Q286K-A289R	1.38
F130L-M138L-E152W-D183N	1.38
N046Q-R047K-N050Y-T054H	1.38
T004V-G024M	1.38
N050Y-T059W-S066Q-S129V	1.37
S023N-G024Y	1.37
T054H-P162Q	1.37
T004S-S023W-G024Y	1.37
N050Y-T054H	1.36
L282F-Q286R-A289R-F169I	1.35
R047K-N050W	1.35
V190F-D220P	1.35
L282M-F173Y	1.34
T004L-S023Y	1.33
N050W-A288D	1.33
V190I-D220P-S265Q	1.33
S265P-L282F-Q286P-A289R	1.24
S265P-L282F-Q286R-A289R	1.39
N046Q-N050Y-T054K	1.33

Tabla 13.2 Resultados ensayo rendimiento BMI para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Líquido BMI Tide® 2X
T059W-S066Q	1.31
T263W-A273H-S285R	1.44
T263W-A273H-S285W	1.27
S023Y-G024M	1.30
T004L-S023N-G024W	1.30
T004V-S023N-G024Y	1.30
T059W-S066N-S129Q	1.30
T004S-S023Y	1.29
T004S-S023N-G024M	1.29
T059W-S066N-A070T	1.29
T059W-S066Q-S129Q	1.29
T263W-A273H	1.29
A273H-S285P	1.28
N046Q-R047K-N050Y-T054L	1.28
N046Q-R047K-N050Y	1.28
R047K-N050Y	1.27
T263H-S285W	1.26
R047K-N050F	1.25
N046Q-R047K-N050F-T054H	1.25
S023N-G024M	1.25
T004S-G024Y	1.24
R047K-N050Y-T054H	1.24
T059W-S066N-S129I	1.22
R047K-T054L	1.21
T004S-S023W-G024W	1.21
M138L-E152F-T146S	1.21
D220P-S265N	1.21
T004S-G024M	1.20
T004V-S023N	1.20
N046Q-N050F-T054K	1.19
N046Q-N050Y-T054H	1.19
Q062H-S066Q-S129Q	1.19
T059W-S129Q	1.19
T059W-S129V	1.19
N050F-T054K	1.18
R047K-N050F-T054L	1.18

Tabla 13.2 Resultados ensayo rendimiento BMI para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Líquido BMI Tide® 2X
V190I-D220P-S265W	1.18
N112I-T263H-A273H-S285R	1.17
T059W-S066N-S129V	1.17
T059W-S066Q-S129I	1.17
T059W-S129I	1.17
T263W-S285P	1.17
V190I-D220P	1.16
A289V-T263H-A273H	1.16
T263H-A273H-S285P	1.16
N90S-A273H-S285P	1.15
R047K-N050Y-T054L	1.15
T004S-S023N	1.15
T059R-S129Q	1.14
N046Q-R047K-T054H	1.14
T059W-S066Q-S129V	1.13
E152W-T179P	1.13
N050Y-S066Q-S129V	1.13
T202S-T263W-A273H	1.13
T263W-A273H-S285P	1.13
M138L-E152W-T179P	1.11
N046Q-R047K	1.10
N046Q-T054H-F176L	1.10
T004L-G024M	1.10
T004S-L282M	1.10
T263H-A273H	1.10
T263H-A273H-S285W	1.10
T004L-S023Y-G024M	1.09
L282F-Q286P	1.09
T004V-S023Y-G024Y	1.09
V190F-S265W	1.09
M138L-E152F	1.08
V190F-D220E-S265W	1.07
N046Q-N050F-T054H	1.06
N157Y-S285W	1.06
T004F-S023Y-G024M	1.06
T004V-S023N-G024M	1.06
L198I-D220E-S265Q	1.05

Tabla 13.2 Resultados ensayo rendimiento BMI para variantes con índice de rendimiento > 1	
Código variante	Líquido BMI Tide® 2X
N046Q-N050Y-T054K-A154T	1.05
S016L-D220E-S265W	1.05
D220E-S265W	1.04
D220E-A237S-S265W	1.04
S066Q-S129Q	1.04
V190F-D220E-S265Q-T267I	1.04
L282M-F173Y-T219S	1.04
E152F-T179P	1.04
V190I-S265W	1.03
M138L-S066Q	1.01
M138L-E152W	1.01
T059W-S066Q-A070T-S129I	1.01
V190F-D220E-S265N	1.01
V190F-S265N	1.01
N046Q-N050Y	1.01
M138L-E152F-T179P	1.00

EJEMPLO 14**Estabilidad de variantes de nprE**

[0311] En este Ejemplo se describen los experimentos realizados para determinar la estabilidad de variantes de nprE. En estos experimentos, se usaron los métodos descritos antes del Ejemplo 1 para determinar los índices de rendimiento (véase «Ensayos de estabilidad de NprE en presencia de detergente», supra). Las siguientes tablas proporcionan los resultados de dichas variantes con índices de rendimiento mayores que uno (PI>1) sometidas a prueba con y sin DTPA.

[0312] La estabilidad se midió al determinar la actividad de AGLA antes y después de la incubación a elevada temperatura. La tabla contiene los valores de estabilidad relativa en comparación con la enzima natural en dichas condiciones. Constituye el cociente de (actividad residual de la variante/actividad residual de la enzima natural). Un valor mayor que uno indica una estabilidad mayor en presencia de detergente. En las Tablas 14.1 y 14.2 se proporcionan los datos que muestran los datos de estabilidad relativa de variantes de sustitución simple de NprE en relación con la estabilidad de la estabilidad de NprE natural en dichas condiciones, con y sin DTPA.

[0313] En las Tablas 14.3 y 14.4 se proporcionan datos que muestran los datos de estabilidad relativa de variantes de sustitución múltiple de NprE en relación con la estabilidad de la estabilidad de NprE natural en dichas condiciones, con y sin DTPA.

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
T004C	1.19
T004E	1.05
T004L	1.13
T004S	1.00
G012D	1.06
G012E	1.06
K013A	1.39
K013C	1.57
K013D	1.09
K013F	1.30
K013G	1.41
K013H	1.34

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
K013I	1.33
K013L	1.56
K013M	1.28
K013N	1.39
K013Q	1.34
K013S	1.35
K013T	1.22
K013V	1.40
K013Y	1.34
S023A	1.01
S023D	1.08
S023F	1.05

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
S023G	1.11
S023I	1.05
S023K	1.07
S023L	1.04
S023M	1.11
S023N	1.09
S023Q	1.03
S023R	1.10
S023S	1.45
S023T	1.06
S023V	1.05
S023W	1.08

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
S023Y	1.15
G024A	1.01
G024D	1.05
G024F	1.08
G024G	1.46
G024H	1.05
G024K	1.08
G024L	1.06
G024M	1.10
G024N	1.11
G024R	1.07
G024S	1.02
G024S	1.02
G024T	1.04
G024W	1.11
G024Y	1.08
Q045D	1.02
Q045E	1.28
N046C	1.29
N046E	1.35
N046Q	1.07
R047K	1.09
R047L	1.13
R047M	1.00
R047S	1.21
N050D	1.04
N050F	1.07
N050P	1.03
N050W	1.04
N050Y	1.04
T054C	1.04
T054D	1.04
T054E	1.03
T054F	1.03

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
T054H	1.11
T054I	1.04
T054K	1.11
T054L	1.08
T054M	1.06
T054N	1.07
T054Q	1.03
T054R	1.04
T054S	1.05
T054V	1.01
T054W	1.07
T054Y	1.07
T059A	1.04
T059C	1.04
T059E	1.02
T059G	1.13
T059H	1.07
T059I	1.01
T059K	1.16
T059M	1.10
T059N	1.15
T059P	1.12
T059Q	1.04
T059R	1.28
T059S	1.04
T059W	1.26
T060N	1.03
T065E	1.01
S066C	1.36
S066D	1.42
S066E	1.58
S066N	1.01
S066Q	1.01
Q087D	1.25

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
Q087E	1.32
N090C	1.10
N090D	1.01
K100H	1.09
K100P	1.01
R110A	1.17
R110C	1.28
R110E	1.20
R110H	1.12
R110K	1.04
R110L	1.23
R110M	1.23
R110N	1.11
R110Q	1.28
R110S	1.10
R110Y	1.12
D119H	1.15
G128C	1.00
S129A	1.06
S129C	1.38
S129D	1.23
S129H	1.30
S129I	1.68
S129K	1.05
S129L	1.35
S129M	1.33
S129Q	1.44
S129T	1.36
S129V	1.55
S129Y	1.06
F130I	1.14
F130K	1.04
F130L	1.52
F130M	1.66

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
F130Q	1.10
F130T	1.41
F130V	1.06
S137A	1.46
M138L	1.43
E152F	1.15
E152H	1.36
E152W	1.31
T179P	1.50
V190I	1.68
V190L	1.93
S199C	1.27
S199E	1.95
Y204T	1.03
K211A	1.96
K211C	1.30
K211D	1.89
K211M	1.20
K211N	1.29
K211Q	2.00
K211S	1.43
K211T	1.18
K211V	1.52
K214A	1.74
K214C	1.62
K214I	1.17
K214M	1.27
K214N	1.35
K214Q	2.09
K214V	2.00
L216C	1.35
T219D	1.05
D220A	1.11
D220E	2.44

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
D220P	2.66
A221D	1.04
A221E	1.57
G222C	1.72
T243C	1.30
T243I	1.17
K244A	1.61
K244C	1.75
K244D	2.00
K244E	1.77
K244F	1.27
K244G	1.23
K244L	1.55
K244M	1.79
K244N	1.25
K244Q	1.82
K244S	1.87
K244T	1.65
K244V	1.82
K244W	1.01
K244Y	1.45
V260E	1.07
V260K	1.17
V260L	1.28
V260M	1.21
V260P	1.22
V260S	1.00
V260T	1.03
V260W	1.02
Y261C	1.28
Y261F	1.07
Y261I	1.20
Y261L	1.14
T263E	1.12

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
T263F	1.19
T263H	1.01
T263L	1.02
T263Q	1.12
T263V	1.25
T263W	1.40
T263Y	1.06
S265A	1.04
S265C	1.11
S265D	1.11
S265E	1.34
S265P	1.72
S265Q	1.00
S265T	1.15
S265V	1.17
K269E	1.61
K269F	1.21
K269G	1.32
K269H	1.63
K269I	1.73
K269L	1.53
K269M	1.52
K269N	1.60
K269P	1.47
K269Q	1.55
K269S	1.51
K269T	1.89
K269V	1.43
K269W	1.00
K269Y	1.38
A273C	1.19
A273D	1.29
A273H	1.14
R280A	1.33

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
R280C	1.96
R280D	1.82
R280E	1.77
R280F	1.46
R280G	1.21
R280H	1.52
R280K	1.14
R280L	1.78
R280M	1.78
R280S	1.46
R280T	1.35
R280W	1.51
R280Y	1.56
L282F	1.06
L282M	1.16
L282Y	1.04
S285A	1.16
S285C	1.27
S285D	1.39
S285E	1.59
S285K	1.00
S285P	1.30
S285Q	1.10
S285R	1.38
S285W	1.28
Q286A	1.04
Q286D	1.08
Q286E	1.31
Q286K	1.09
Q286P	1.15
Q286R	1.18
A289C	1.24
A289D	1.04
A289E	1.15

Tabla 14.1 Resultados de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de 25 % de Tide 2x con DTPA
A289L	1.05
A293C	1.11
N296D	1.11
N296E	1.87
N296V	1.37
A297C	1.07

Tabla 14.2 Estabilidad de variantes en Tide® 2X sin DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide 2x sin DTPA
T004C	1.16
T004V	1.04
K013A	1.52
K013C	1.83
K013D	1.47
K013F	1.02
K013G	1.61
K013H	1.62
K013I	1.19
K013L	1.54
K013M	1.48
K013N	1.70
K013Q	1.55
K013S	1.56
K013T	1.39
K013V	1.49
K013Y	1.39
S023A	1.03
S023D	1.23
S023G	1.25
S023M	1.05
S023N	1.25
S023Q	1.10
S023S	1.50
S023W	1.02
S023Y	1.07
G024D	1.05
G024G	1.41
Q045C	1.01
Q045D	1.02
Q045E	1.41
Q045M	1.01
N046C	1.53
N046E	1.41
R047K	1.12
R047L	1.20
R047M	1.08

Tabla 14.2 Estabilidad de variantes en Tide® 2X sin DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide 2x sin DTPA
R047Q	1.13
R047S	1.25
Y049D	1.16
Y049H	1.02
Y049N	1.07
Y049S	1.01
N050D	1.08
N050F	1.07
N050G	1.02
N050P	1.23
N050W	1.01
T054C	1.07
T054D	1.01
T054E	1.08
T054H	1.08
T054I	1.09
T054K	1.03
T054L	1.09
T054Q	1.09
T054V	1.14
T054W	1.02
T054Y	1.14
T059A	1.05
T059C	1.07
T059E	1.25
T059M	1.04
T059P	1.18
T059Q	1.05
T059S	1.09
T065C	1.04
T065E	1.07
S066C	1.61
S066D	1.61
S066E	1.80
S066N	1.08
Q087D	1.27
Q087E	1.30

Tabla 14.2 Estabilidad de variantes en Tide® 2X sin DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide 2x sin DTPA
N090C	1.09
N090D	1.00
N090E	1.03
K100A	1.00
K100D	1.07
K100E	1.03
K100F	1.07
K100H	1.16
K100N	1.06
K100P	1.06
K100Q	1.06
K100S	1.05
K100Y	1.10
R110A	1.11
R110C	1.24
R110E	1.19
R110H	1.09
R110K	1.08
R110L	1.11
R110M	1.12
R110N	1.18
R110Q	1.25
R110S	1.09
R110Y	1.16
D119H	1.03
G128C	1.15
S129A	1.13
S129C	1.86
S129D	1.52
S129H	1.60
S129I	2.32
S129K	1.18
S129L	1.70
S129M	1.64
S129Q	1.86
S129T	1.59
S129V	2.34

Tabla 14.2 Estabilidad de variantes en Tide® 2X sin DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide 2x sin DTPA
S129Y	1.28
F130I	1.18
F130L	1.29
F130M	1.44
F130Q	1.17
F130T	1.32
F130V	1.05
S137A	1.37
M138L	1.11
E152A	1.01
E152C	1.16
E152F	1.32
E152H	1.53
E152N	1.12
E152W	1.32
N155Q	1.07
T179P	1.33
V190I	1.37
V190L	1.40
S199C	1.18
S199D	1.11
S199E	1.71
K211A	1.77
K211C	1.18
K211D	1.67
K211G	1.06
K211M	1.17
K211N	1.44
K211Q	1.51
K211S	1.44
K211T	1.17
K211V	1.26
K214A	1.47
K214C	1.54
K214E	1.42
K214I	1.14
K214M	1.19
K214N	1.15

Tabla 14.2 Estabilidad de variantes en Tide® 2X sin DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide 2x sin DTPA
K214Q	1.84
K214V	1.79
L216C	1.31
D220A	1.07
D220E	2.23
D220P	2.24
A221D	1.15
A221E	1.47
G222C	1.89
T243C	1.34
T243I	1.13
K244A	1.57
K244C	1.40
K244D	1.58
K244E	1.56
K244F	1.05
K244G	1.01
K244L	1.38
K244M	1.37
K244N	1.18
K244Q	1.42
K244S	1.55
K244T	1.51
K244V	1.42
K244Y	1.19
V260K	1.09
V260L	1.08
V260P	1.12
V260Y	1.02
Y261I	1.19
Y261L	1.11
T263F	1.11
T263H	1.03
T263M	1.08
T263Q	1.04
T263V	1.22
T263W	1.37
T263Y	1.05

Tabla 14.2 Estabilidad de variantes en Tide® 2X sin DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide 2x sin DTPA
S265C	1.03
S265D	1.02
S265E	1.22
S265N	1.07
S265P	1.43
S265T	1.10
S265V	1.09
K269E	1.33
K269F	1.10
K269G	1.17
K269H	1.52
K269I	1.34
K269L	1.34
K269M	1.34
K269N	1.25
K269P	1.26
K269Q	1.39
K269S	1.50
K269T	1.32
K269V	1.39
K269Y	1.38
A273C	1.12
A273D	1.16
A273H	1.10
R280A	1.32
R280C	1.77
R280D	1.52
R280E	1.67
R280F	1.37
R280G	1.16
R280H	1.31
R280K	1.07
R280L	1.64
R280M	1.60
R280S	1.46
R280T	1.28
R280V	1.10
R280W	1.42

Tabla 14.2 Estabilidad de variantes en Tide® 2X sin DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide 2x sin DTPA
R280Y	1.49
L282M	1.03
S285A	1.03
S285C	1.10
S285D	1.25
S285E	1.36
S285P	1.14
S285Q	1.05
S285R	1.10
S285W	1.12
Q286D	1.05
Q286E	1.17
Q286P	1.04
Q286R	1.02
A289C	1.05
A289E	1.13
A289L	1.06
N296C	1.01
N296D	1.02
N296E	1.67
N296V	1.32
A297C	1.02

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA [Índ. rend.]
V190L-D220E-S265Q	2.43
V190I-D220E-S265W	2.38
V190L-D220E-S265N	2.34
T059R-S066Q-S129I	2.33
V190I-D220E-S265N	2.32
V190L-D220E-S265W	2.30
V190I-D220E	2.29
T059W-S066N-S129V	2.28
T059K-S066Q-S129V	2.27
T059K-Y082C-S129V	2.27
T059R-S066N-S129I	2.27
S066Q-S129V	2.25
T059R-S066Q-S129V	2.25
T059R-S129I	2.24
N050Y-T059W-S066N-S129V	2.21
D220P-S265N	2.21
S066Q-S129I	2.21
T059W-S066Q-S129V	2.20
T059K-S066Q-S129I	2.20
T059R-S129V	2.19
N050Y-S066Q-S129V	2.19

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA [Índ. rend.]
T059W-S066Q-S129I	2.19
N050Y-T059W-S066Q-S129V	2.18
T059K-S129I	2.17
D220P-S265W	2.17
F130L-M138L-T179P	2.16
S066N-S129I	2.15
T059R-S066N-S129V	2.15
F130I-M138L-T179P	2.14
T059R-S066Q-N092S-S129I	2.13
S066N-S129V	2.11
D220E-S265Q	2.11
F130L-M138L-E152W-T179P	2.10
T059W-S129V	2.10
S265P-L282M-Q286R-A289R	2.09
S265P-L282F-Q286R-A289R	2.09
T059W-S066N-S129I	2.08
V190I-D220P-S265W	2.08
F130L-E152W-T179P	2.06
F130L-M138L-E152F-T179P	2.06
Q062K-S066Q-S129I	2.04
T059K-S066N-S129I	2.04
E152H-T179P	2.03

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA [índ. rend.]
S265P-L282M-Q286K-A289R	2.03
F130L-M138L-E152H-T179P	2.02
T263W-A273H-S285R	2.00
D220E-S265N	1.99
F130I-M138L-E152H-T179P	1.99
F130V-M138L-E152W-T179P	1.99
F130I-M138L-E152W-T179P	1.99
T059W-S129I	1.97
D220E-S265W	1.97
F130V-M138L-T179P	1.96
F130L-E152V-T179P	1.96
T059R-S129Q	1.95
T263W-S285P	1.94
F130I-M138L-E152F-T179P	1.93
E152W-T179P	1.93
V190L-S265Q	1.93
F130L-E152F-T179P	1.92
L282M-Q286R-A289R-P162S	1.91
D220P-S265Q	1.91
M138L-E152F-T179P	1.91
F130I-E152H-T179P	1.91
M138L-E152W-T179P	1.91
F130L-T179P	1.90

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA [índ. rend.]
F130L-M138L-E152W-T179P-Q286H	1.90
F130L-M138L-E152H	1.89
T263W-A273H-S285W	1.89
S265P-Q286K	1.88
T059W-S066Q-S129Q	1.87
T263W-S285R	1.85
T059W-S066N-S129Q	1.83
T263W-S285W	1.83
T059R-S066N-S129Q	1.83
S265P-L282M-Q286R-A289R-T202S-K203N	1.81
T059W-S129Q	1.81
Q062H-S066Q-S129Q	1.81
L282M-Q286R-A289R	1.80
V190L-D220E-S265N-V291I	1.80
V190L-S265N	1.80
F130L-M138L-E152W	1.79
N050Y-T059R-S129Q	1.79
F130I-T179P	1.78
T059K-S066Q-S129Q	1.78
T059K-S129Q	1.78
S265P-L282M-Q286P-A289R	1.77

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA (índ. rend.1)
S265P-L282F-Q286P-A289R	1.77
T263W-A273H-S285P	1.77
S265P-L282M-Q286K	1.76
S016L-D220E-S265W	1.76
S066Q-S129Q	1.76
S265P-L282M-Q286P	1.75
L282F-Q286R-A289R	1.75
F130V-E152W-T179P	1.74
L044Q-T263W-S285R	1.74
L055F-T059W-S129V	1.74
V190L-S265W	1.74
Q286R-A289R	1.74
G99D-S265P-L282F-Q286K-A289R	1.73
F130L-M138L-E152F	1.73
T059R-S066Q-S129Q	1.72
F130L-E152H	1.71
S066N-S129Q	1.71
T004S-S023N-G024M-K269N	1.71
S265P-L282M	1.71
E152F-T179P	1.71
T059W-S066N-S129V-S290R	1.68

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA (índ. rend.1)
L282F-Q286K-A289R	1.67
F130L-M138L	1.66
F130I-M138L-E152W	1.65
S265P-L282F	1.65
F130I-M138L-E152H	1.65
F130V-M138L-E152H	1.64
V190I-S265Q	1.64
M138L-E152M	1.61
S265P-L282F-Q286P	1.59
M138L-E152H	1.59
T059K-S066N-K088E	1.59
V190I-S265W	1.59
F130L-E152W	1.59
L282M-Q286K-A289R	1.58
L282M-Q286K-A289R-I253V	1.57
T263W-A273H	1.56
V190I-S265N	1.55
M138L-E152W	1.55
A273H-S285R	1.52
F130I-M138L	1.51
F130L-E152F	1.50
F130V-M138L-E152W	1.50
T059K-S066Q-V102A-S129Q	1.48
F130V-E152H-T179P	1.47
F130I-M138L-E152F	1.47

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA [Índ. rend.]
F130V-M138L-E152F	1.44
M138L-E152F	1.44
L282M-Q286R	1.43
F130I-E152H	1.43
S265P-L282F-A289R-T065S	1.43
T263H-A273H-S285R	1.43
F130V-M138L	1.42
T014M-T059R-S129V	1.42
L282M-Q286R-A289R-K11N	1.41
A273H-S285P	1.41
L282M-Q286K-A289R-S132T	1.40
T263H-A273H-S285W	1.39
F130V-E152W	1.38
S265P-L282F-Q286K-N061Y	1.37
F130I-E152W	1.36
L198I-D220E-S265Q	1.36
V190I-S265L	1.36
T263H-S285W	1.35
S265P-L282F-A289R	1.34
M138L-S066Q	1.32
F130I-E152F	1.32
N90S-A273H-S285P	1.31
S032T-T263H-A273H-S285R	1.31
L282F-Q286P-A289R	1.28

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA [Índ. rend.]
N157Y-T263W-A273H-S285R	1.27
V105A-S129V	1.26
T263H-A273H-S285P	1.25
S129Q-L282H	1.23
T059W-S066Q	1.23
F130V-E152H	1.21
S023W-G024Y	1.21
T004V-S023N	1.21
T059R-S066Q	1.21
N050W-T054L	1.20
L282M-Q286P-A289R	1.20
A115V-V190L-S265W	1.19
L282M-Q286K	1.19
T059R-S066N	1.18
L282F-Q286P	1.15
T004V-S023W-G024M	1.15
S265P-L282F-Q286R-L78H	1.15
L282F-Q286K	1.14
T004V-S023W-G024Y	1.14
S023W-G024M	1.13
T059R-R256S	1.13
F130V-E152F	1.12
T004V-G024W	1.12
N050W-T054K	1.11
S023Y-G024M	1.11
T004V-S023Y	1.11
T004V-S023Y-G024M	1.11
N050Y-T054H	1.10

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA [índ. rend.]
S023W-G024W	1.10
T004V-S023Y-G024Y	1.10
T004V-S023N-G024W	1.09
F130L-M138L-E152F-T179P-V291I	1.09
N050Y-T059K-S066Q	1.09
T004V-S023Y-G024W	1.09
T059K-S066N	1.09
T004V-S023N-G024Y	1.09
S023Y-G024W	1.09
N050F-T054L	1.08
R047K-T054K	1.08
S023N-G024W	1.07
L282M-A289R	1.07
S023Y-G024Y	1.07
T004V-G024M	1.07
L282F	1.06
R047K-N050F-T054K	1.06
N050F-T054K	1.05
T059K-S066Q	1.05
S023N-G024M	1.05
S023N-G024Y	1.04
T004L-S023N	1.04
R047K-N050W-T054H	1.04
T004L-S023W-G024Y	1.04
T004S-S023W	1.03
N046Q-N050W-T054H-A142T	1.03

Tabla 14.3 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X con DTPA	
Código variante	Estabilidad en presencia de Tide® 2X con DTPA [índ. rend.]
T004L-S023Y	1.03
T004V-S023W	1.03
N050W-T054H	1.02
T004S-S023N	1.02
T004S-L282M	1.02
T004L-S023W	1.02
N050F-T054H	1.01
N050Y-T054L	1.00
R047K-N050W-T054K	1.00

Tabla 14.4 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X sin DTPA	
Código variante	Resultados de ensayo estabilidad en presencia de Tide® 2X sin DTPA [Índ. rend.]
S066Q-S129V	2.24
S066Q-S129I	2.19
N050Y-S066Q-S129V	2.12
S066N-S129I	2.08
T059K-S066Q-S129V	2.06
S066N-S129V	2.05
F130L-E152W-T179P	1.98
S265P-L282M-Q286R-A289R	1.96
F130L-E152V-T179P	1.96
T059K-S066Q-S129I	1.91
T263W-S285P	1.85
T059K-S066N-S129I	1.84
T263W-A273H-S285P	1.83
S265P-L282F-Q286R-A289R	1.83
F130V-E152W-T179P	1.83
T263W-A273H-S285R	1.82
V190I-D220P-S265W	1.79
F130L-E152H	1.78
S066N-S129Q	1.77
S265P-L282M-Q286K-A289R	1.77
V190I-D220E	1.76
T059R-S066N-S129I	1.76

Tabla 14.4 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X sin DTPA	
Código variante	Resultados de ensayo estabilidad en presencia de Tide® 2X sin DTPA [Índ. rend.]
V190I-D220E-S265W	1.75
T059K-S129I	1.75
T059R-S066Q-S129I	1.75
F130I-M138L-E152H-T179P	1.74
F130I-T179P	1.74
T263W-A273H-S285W	1.73
S016L-D220E-S265W	1.72
S066Q-S129Q	1.72
V190I-D220E-S265Q	1.72
T059R-S066Q-S129V	1.71
D220E-S265N	1.69
V190L-D220E	1.69
D220E-S265W	1.68
V190I-D220P	1.68
V190L-D220E-S265N	1.68
L044Q-T263W-S285R	1.67
S265P-L282M-Q286P-A289R	1.67
F130L-M138L-E152H-T179P	1.66
T263W-S285R	1.66
L282M-Q286R-A289R	1.65
T263W-S285W	1.65
F130I-E152H-T179P	1.65

Tabla 14.4 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X sin DTPA	
Código variante	Resultados de ensayo estabilidad en presencia de Tide® 2X sin DTPA [Índ. rend.]
V190I-D220E-S265N	1.64
V190L-D220E-S265W	1.63
V190I-D220P-S265Q	1.63
T059R-S066N-S129V	1.62
V190L-D220E-S265Q	1.62
E152H-T179P	1.62
F130L-M138L-E152F-T179P	1.61
Q062H-S066Q-S129Q	1.59
T059R-S129V	1.58
V190I-D220E-S265W-L282F	1.58
V190I-S265Q	1.58
F130L-E152F-T179P	1.58
D220E-S265Q	1.57
E152W-T179P	1.56
T059K-S066Q-S129Q	1.56
F130L-M138L-T179P	1.55
F130I-M138L-E152F-T179P	1.55
F130L-M138L-E152W-T179P	1.54
N050Y-T059W-S066Q-S129V	1.54
S265P-L282M-Q286K	1.54
T059R-S129I	1.53

Tabla 14.4 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X sin DTPA	
Código variante	Resultados de ensayo estabilidad en presencia de Tide® 2X sin DTPA [Índ. rend.]
F130V-E152H-T179P	1.53
D220P-S265N	1.52
S265P-L282M-Q286P	1.51
F130I-E152H	1.51
T059R-S066Q-N092S-S129I	1.51
F130L-T179P	1.49
G99D-S265P-L282F-Q286K-A289R	1.48
T263W-A273H	1.48
V190I-S265N	1.48
D220P-S265W	1.47
F130L-E152W	1.47
F130L-M138L-E152H	1.46
S265P-L282M	1.45
V190I-S265Q	1.45
F130L-E152F	1.45
T059K-S129Q	1.45
Q286R-A289R	1.45
M138L-E152W-T179P	1.44
F130I-M138L-E152H	1.43
D220P-S265Q	1.42
V190L-S265N	1.42
F130I-M138L-E152W	1.42
S265P-Q286K	1.41
V190L-S265Q	1.41
V190I-S265W	1.40

Tabla 14.4 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X sin DTPA	
Código variante	Resultados de ensayo estabilidad en presencia de Tide® 2X sin DTPA [Ind. rend.]
F130L-M138L-E152F	1.40
F130V-E152H	1.40
E152F-T179P	1.39
N050Y-T059W-S066N-S129V	1.38
T059R-S066N-S129Q	1.38
F130I-E152W	1.37
F130V-E152W	1.37
T059R-S066Q-S129Q	1.37
T263H-A273H-S285P	1.36
N90S-A273H-S285P	1.36
V190L-D220E-S265N-V291I	1.36
T059R-S129Q	1.35
A273H-S285P	1.34
F130I-M138L-E152W-T179P	1.34
F130V-M138L-E152F	1.34
N050Y-T059R-S129Q	1.34
T059W-S066Q-S129I	1.34
F130V-M138L-T179P	1.34
F130V-M138L-E152W-T179P	1.33
V190L-S265W	1.33
F130V-M138L-E152W	1.32

Tabla 14.4 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X sin DTPA	
Código variante	Resultados de ensayo estabilidad en presencia de Tide® 2X sin DTPA [Ind. rend.]
T059W-S066Q-S129V	1.32
V190I-S265Q	1.32
F130V-M138L-E152H	1.32
F130I-E152F	1.31
N157Y-T263W-A273H-S285R	1.31
T263H-S285W	1.30
M138L-E152F-T179P	1.30
A115V-V190L-S265W	1.29
M138L-E152M	1.29
T263H-A273H-S285W	1.29
F130L-M138L-E152W	1.28
T059K-S066N-K088E	1.28
F130I-M138L-E152F	1.27
F130I-M138L-T179P	1.27
T004V-S023N	1.26
T059K-S066Q-V102A-S129Q	1.26
F130L-M138L	1.26
N047K-N050F-T054K	1.24
T263H-A273H-S285R	1.24
F130L-M138L-E152W-T179P-Q286H	1.23
M138L-E152H	1.22

Tabla 14.4 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X sin DTPA	
Código variante	Resultados de ensayo estabilidad en presencia de Tide® 2X sin DTPA [Índ. rend.]
M138L -S066Q	1.22
L282M-Q286R-A289R-P162S	1.21
L282F-Q286R-A289R	1.21
Q062K-S066Q-S129I	1.21
A273H-S285R	1.20
S265P-L282F-Q286P	1.20
S265P-L282F-Q286P-A289R	1.20
S265P-L282M-Q286R-A289R-T202S-K203N	1.19
T059W-S066N-S129I	1.19
V190I-S265L	1.18
T059W-S066N-S129V	1.18
F130I-M138L	1.16
L282M-Q286K-A289R-I253V	1.16
R047K-N050F-T054K	1.15
M138L-E152F	1.15
N050W-T054K	1.15
L198I-D220E-S265Q	1.13
L282F-Q286K-A289R	1.13
N050F-T054K	1.13
L282M-Q286R	1.13
M138L-E152W	1.13
S265P-L282F	1.12

Tabla 14.4 Resultados de ensayo de estabilidad en presencia de 25 % de TIDE® 2X sin DTPA	
Código variante	Resultados de ensayo estabilidad en presencia de Tide® 2X sin DTPA [Índ. rend.]
F130V-E152F	1.12
T059W-S066N-S129Q	1.10
F130V-M138L	1.09
T263H-A273H	1.09
L282M-Q286K-A289R	1.07
N046Q-N050W-T054H-A142T	1.07
T059W-S066Q-S129Q	1.07
S265P-L282F-A289R-T065S	1.07
N050F-T054H	1.07
S129Q-L282H	1.06
L282M-Q286K-A289R-S132T	1.03
L282M-Q286R-A289R-K11N	1.03
T059K-S066N	1.02
R047K-N050W-T054K	1.01
T059K-S066Q	1.01
T004V-S023Y	1.01
T059W-S066N-S129V-S290R	1.00
N050Y-T059K-S066Q	1.00
R047K-N050Y	1.00

[0314] Los datos de la siguiente tabla (Tabla 14.5) representan los datos de estabilidad relativa de variantes de NprE en relación con la estabilidad de la estabilidad de NprE natural en el ensayo de estabilidad del citrato. La estabilidad se midió al determinar la actividad de caseína por medio de la determinación de la actividad de AGLA antes y después de la incubación a elevada temperatura (véase «Ensayo de estabilidad del citrato», supra). La tabla contiene los valores de estabilidad relativa en comparación con la enzima natural en dichas condiciones. Se presenta como el cociente de (actividad residual de la variante/actividad residual de la enzima natural). Un valor mayor que uno indica una estabilidad mayor en presencia de detergente.

Tabla 14.5. Resultados ensayo estabilidad citrato	
Código variante	Estabilidad citrato relativa
K013C	1.22
K013D	1.32
K013E	1.07
K013H	1.50
K013Q	1.38
K013S	1.11
T014G	1.31
T014H	1.75
T014K	1.62
T014M	1.09
T014P	1.07
T014Q	2.01
T014R	1.32
T014V	1.03
S023A	1.12
S023G	1.13
S023I	1.13
S023K	1.39
S023M	1.00
S023N	1.42
S023T	1.15
S023V	1.20
S023W	1.22
G024D	1.38
G024F	1.90
G024H	1.09
G024M	1.23

Tabla 14.5. Resultados ensayo estabilidad citrato	
Código variante	Estabilidad citrato relativa
G024R	1.03
G024S	1.11
G024T	1.03
G024W	1.03
Q045D	1.07
Q045E	1.12
Q045M	1.02
Q045N	1.16
Q045P	1.44
N046G	1.10
N046H	1.05
N046I	1.46
N046P	1.47
N046V	1.11
N046Y	1.01
R047E	1.09
R047T	1.07
Y049A	1.02
Y049C	1.03
Y049D	1.01
Y049E	1.04
Y049I	1.08
Y049K	1.04
Y049T	1.16
Y049V	1.19
Y049W	1.00
T054D	1.01

Tabla 14.5. Resultados ensayo estabilidad citrato	
Código variante	Estabilidad citrato relativa
T054H	1.09
T054K	1.02
T054L	1.06
T054P	1.63
T054Q	1.17
T054R	1.11
T054S	1.09
T054W	1.02
S058I	1.23
S058L	1.71
S058N	1.08
S058P	2.53
T059E	1.08
T059H	1.19
T059I	1.02
T059K	1.21
T059L	1.16
T059M	1.04
T059S	1.07
S066D	1.03
S066E	1.03
S066P	1.13
S066Q	1.05
S066T	1.17
S066V	1.00
Q087A	1.05
Q087L	1.08

**Tabla 14.5. Resultados
ensayo estabilidad citrato**

Código variante	Estabilidad citrato relativa
Q087S	1.15
Q087T	1.19
N090D	1.17
N090F	1.02
N090G	1.04
N090L	1.25
N090T	1.02
N096G	1.02
K100D	1.30
K100N	1.28
K100P	1.04
K100V	1.01
D119H	1.05
D119T	1.03
D119W	1.00
G136I	1.10
G136L	1.20
G136P	2.19
G136V	2.03
G136W	2.23
G136Y	1.56
M138L	1.48
D139A	2.52
D139C	2.22
D139E	1.51
D139G	2.54
D139H	1.88
D139I	2.40
D139K	2.27
D139L	1.53
D139M	2.49
D139P	2.21
D139R	2.54
D139S	2.22
D139V	1.51
D139W	1.94
D139Y	2.54
E152C	1.17
E152F	1.21

**Tabla 14.5. Resultados
ensayo estabilidad citrato**

Código variante	Estabilidad citrato relativa
E152G	1.09
E152H	1.29
E152R	1.12
E152S	1.17
E152W	1.21
D178A	2.07
D178C	1.79
D178G	2.35
D178H	2.07
D178K	1.73
D178L	1.74
D178M	2.40
D178N	2.34
D178P	1.83
D178Q	1.22
D178R	2.00
D178S	2.58
D178T	1.75
D178V	1.73
D178W	1.02
D178Y	1.78
E186A	2.31
E186C	2.42
E186D	2.03
E186G	2.09
E186H	1.87
E186K	2.69
E186L	1.75
E186M	2.62
E186N	1.72
E186P	2.60
E186Q	1.92
E186R	2.69
E186S	2.57
E186T	2.69
E186V	2.10
E186W	2.47
E186Y	2.48
V190I	1.38

**Tabla 14.5. Resultados
ensayo estabilidad citrato**

Código variante	Estabilidad citrato relativa
V190L	1.41
K211A	1.33
K211M	1.26
K211Q	1.16
K211S	1.28
K214A	1.38
K214C	1.12
K214E	1.08
K214I	1.30
K214L	1.14
K214M	1.03
K214Q	1.47
K214R	1.12
K214S	1.05
K214V	1.49
L216A	1.05
L216C	1.04
L216S	1.19
D220E	1.69
D220H	1.17
D220K	1.17
D220N	1.01
D220P	1.20
A221D	1.11
A221S	1.05
G222C	1.01

EJEMPLO 15

Perfil de rendimiento de pH de nprE en comparación con BPN' 217L

[0315] En este Ejemplo se describen los experimentos realizados para evaluar el rendimiento comparativo de nprE y BPN' Y217L. En estos experimentos, se usaron manchas de EMPA 116 (BMI) y de hierba Equest.

5 Materiales:

[0316]

NprE, 8 mg/mL

BPN' Y217L, 25.6 mg/mL

Tela ensuciada de EMPA 116, 3" x 4.5" (7.62 cm x 11.43 cm) (Testfabrics)

10 Hierba Equest (med.), 3" x 4" (7.62 cm x 10.16 cm) (Warwick Equest)

Muestras de algodón blanco EMPA 221, 3" x 4.5" (1.62 cm x 11.43 cm)

Colorímetro Minolta CR200

TIDE@ 2005 (proporcionado por Procter & Gamble)

15 Concentrado de dureza del agua: 15 000 granos por galón (gpg) (256 500 ppm), 3:1 Ca:Mg 1 M de tampón Bis-TRIS-propano

Ácido sulfúrico conc.

Mezcladora de 50 L con grifo y agitador

Terg-O-Tometer

Agua desionizada

20 **[0317]** Las muestras se prepararon para su tratamiento. Se realizó el tratamiento por triplicado, usándose 18 muestras por tratamiento. Las muestras de hierba se prepararon en un cuarto oscuro para evitar que se descoloraran. Se obtuvieron los valores de reflectancia de alrededor de 18 muestras sucias por medio de un colorímetro Minolta. Se obtuvieron tres lecturas por muestra. Se registraron los valores L, el valor L medio y la desviación típica. Este es el valor L_{inicial} .

25 **[0318]** La solución de detergente se preparó del modo siguiente (para 40 L en total). Se prefirió preparar esta solución la noche antes de la prueba. La solución se almacenó en frío toda la noche. La solución se preparó al añadir 39.724 Kg de agua desionizada a la mezcladora de 50 L, activar el agitador, añadir a la mezcla 60 gramos de detergente líquido TIDE®, añadir a la mezcla 16 mL de solución de dureza del agua y 200 mL de 1 M de Bis-TRIS-propano. El pH se ajustó por medio de ácido sulfúrico concentrado (ajustado a 0.2 unidades de pH por debajo del pH deseado, si la solución se almacenó toda la noche, pues el pH aumenta lentamente por la noche). Las concentraciones finales fueron: TIDE® = 1.5 g/L; dureza del agua = 6 gpg (105 ppm); y Bis-TRIS-propano = 5 mM.

35 **[0319]** Para realizar las pruebas en el Terg-O-Tometer, se añadió 1 L de solución de detergente a cada recipiente del Terg y se dejó que tomara temperatura. Se añadió enzima a los recipientes en diversas concentraciones. Para las pruebas de BMI, las concentraciones enzimáticas usadas fueron 0 mg/L, 0.275 mg/L, 0.55 mg/L, 1.65 mg/L, 2.65 mg/L y 5.50 mg/L. Para las manchas de hierba, las concentraciones de nprE usadas fueron 0 mg/L, 0.1925 mg/L, 0.385 mg/L, 1.155 mg/L, 1.925 mg/L y 3.85 mg/L (las concentraciones de BPN' Y217L fueron las mismas que las usadas en las pruebas de BMI). Se inició la agitación y se añadieron las muestras. Todas las muestras duplicadas se analizaron en paralelo en el mismo Terg-O-Tometer (por ejemplo, 0X y ½ X la primera lectura, 1X y 3X la segunda lectura y 5X y 10X la tercera lectura). La temperatura fue de 15 °C, la velocidad de agitación fue de 100 cpm y el tiempo de lavado fue de 12 minutos. Las muestras tratadas se aclararon tres veces en 4 L de agua del grifo (~6 gpg o ~105 ppm). Las muestras se secaron al aire toda la noche sobre papel de cocina. Las muestras de hierba se taparon con papel de cocina y se dejaron secar en una habitación oscura. Los valores de reflectancia de las muestras secadas se determinaron del modo descrito anteriormente. Se obtuvieron tres lecturas por muestra. Se registraron los valores L, el valor L medio y la desviación típica. Este es el valor L_{final} .

[0320] El porcentaje de eliminación de suciedad (% SR) se determinó para cada condición de prueba y para ambas enzimas por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ SR} = \frac{(L_{\text{final}} - L_{\text{inicial}})}{(L_0 - L_{\text{inicial}})} \times 100 \%$$

Donde: L_0 = reflectancia de muestras sin ensuciar

L_{inicial} = reflectancia de muestras sucias

L_{final} = reflectancia de muestras lavadas

[0321] El %SR delta sin control de enzimas se determinó por medio de la siguiente fórmula:

$$\Delta \% \text{ SR} = \% \text{ SR}_{\text{tratamiento}} - \% \text{ SR}_{\text{sin control enzimas}}$$

[0322] BPN' Y217L se comparó con nprE en EMPA 116 (BMI) a valores de pH de 6.7, 7.5, 8.5 y 9.5. El rendimiento de nprE sobre EMPA 116 parecía estar en su punto máximo a un pH de 8 aproximadamente, mientras que el rendimiento de BPN' Y217L estaba en su punto máximo a un pH de 8.8 aproximadamente. Los resultados mostraron que la nprE tenía un mejor rendimiento que BPN' Y217L a un pH de 7.5 y 8.5, aunque no tiene un rendimiento tan bueno como BPN' Y217L a un pH de 6.7. El rendimiento de estas enzimas fue igual a un pH de 9.5. Asimismo, no hubo diferencia en el rendimiento de dichas enzimas en hierba Equest (med.) a un pH de 7.8-8.4.

EJEMPLO 16

Comparación de enzimas de PMN y nprE en detergente líquido

[0323] Este Ejemplo describe los experimentos de limpieza para determinar el rendimiento de limpieza de PMN y nprE. El rendimiento de limpieza de las enzimas de PMN y nprE se sometió a prueba en detergente líquido TIDE® en comparación con una proteasa serínica de referencia (Proteasa A) en manchas sensibles a la proteasa. Como se muestra en la siguiente tabla, PMN y nprE eliminan las manchas mucho mejor que la proteasa A, incluso en niveles de enzimas bajos. En las siguientes tablas, los valores más altos de SRI indican un mejor rendimiento de limpieza.

Tabla 16.1. Comparación de rendimiento de limpieza de PMN frente a Proteasa A en TIDE® líquido (en lavadora de tamaño normal)

Proteína enzimática activa en la solución de lavado	0.55 ppm Proteasa A	0.55 ppm PMN	5.50 ppm Proteasa A	5.50 ppm PMN
SRI en manchas de hierba de suciedad ligera	53.1	60.8	60.7	67.2
SRI en manchas de hierba de suciedad media	46.5	55.0	54.2	59.8
SRI en manchas de hierba muy sucias	39.1	45.8	44.5	51.6

Tabla 16.2. Comparación de rendimiento de limpieza de PMP frente a Proteasa A en TIDE® líquido (en lavadora de tamaño mini)

Proteína enzimática activa en la solución de lavado	0.55 ppm Proteasa A	0.55 ppm PMN
SRI en manchas de hierba de suciedad ligera	28.1	52.8
SRI en manchas de hierba de suciedad media	22.8	33.1
SRI en manchas de hierba muy sucias	19.9	24.2

Tabla 16.3. Comparación de rendimiento de limpieza de nprE frente a Proteasa A en TIDE@ líquido (en lavadora de tamaño mini)

Proteína enzimática activa en la solución de lavado	0.55 ppm Proteasa A	2.75 ppm Proteasa A	5.50 ppm Proteasa A	0.28 ppm nprE
SRI en manchas de hierba de suciedad ligera	26.3	30.8	30.7	31.5
SRI en manchas de BMI	19.4	24.9	21.4	25.0
Manchas de potito de carne de vacuno	63.2	68.8	69.4	71.1

EJEMPLO 17

5

Termoestabilidad de NprE y variantes de NprE

10 [0324] En este Ejemplo, se describen los experimentos realizados para determinar la termoestabilidad de NprE y variantes de NprE. Las enzimas se produjeron y purificaron del modo descrito anteriormente. Se estimó que las proteínas purificadas eran lo bastante homogéneas, con una pureza superior al 95 % determinada mediante SDS-PAGE al 10 %, pues se observó una sola proteína importante en el gel. Esta proteína fue de aproximadamente 32 kDa, que es el peso molecular de la secuencia de nprE madura. La proteína se formuló para su almacenamiento por medio de 25 mM del tampón MES, pH 5.8, que contenía 1 mM de cloruro de zinc, 4 mM de cloruro de calcio y propilenglicol al 40 %. Los ensayos usados en estos experimentos fueron el ensayo de proteasas por medio de la actividad de fluorescencia de AGLA descrita anteriormente y la calorimetría diferencial de barrido (DSC), que se describe a continuación.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

20 [0325] Las curvas de capacidad calorífica excesiva se midieron mediante un microcalorímetro de barrido ultrasensible de gran capacidad VP-Cap DSC (Microcal). El procedimiento estándar para las medidas de DSC y la teoría de la técnica son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Freire, 1995) *Meth. Mol. Biol.*, 41, 191-218 [1995]). En pocas palabras, se necesitaron aprox. 500 μ L de 200-400 ppm de muestras de proteínas concentradas puras o ultrafiltradas (UFC). Normalmente, se analizaron 400 ppm de NprE y de las
25 proteínas variantes (en ausencia y en presencia de 130 mM de citrato) en el intervalo de temperatura de 20-100 °C mediante una tasa de barrido de 200 °C/h en 5 mM de tampón HEPES, pH 8.0. La misma muestra se volvió a barrer luego para comprobar la reversibilidad del proceso. Para NprE, el proceso de despliegue térmico fue irreversible. Se evaluaron los datos de dependencia de la tasa de barrido de la fusión térmica para NprE en una tasa de barrido de 25 a 200 °C/h. También se evaluó el efecto de diversos aditivos (por ejemplo, alcoholes primarios y secundarios, sales, ciclodextrina, PEG, sorbitol, glicerol) en el punto de fusión térmica de NprE.

Resultados

35 [0326] Se determinó la estabilidad térmica de NprE natural en dos concentraciones distintas con el objetivo de mostrar el efecto de la concentración de proteínas en el punto de fusión térmica. Se determinó que los valores de T_m para 220 ppm y 440 ppm eran de 67.6 ± 0.5 y 69.2 ± 0.5 °C, respectivamente. El efecto de concentración de proteínas destaca un evento de segundo orden. Se contempla que se trata o de agregación o bien de autólisis. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún mecanismo en concreto. No obstante, estos resultados indican que se necesita que las concentraciones de proteínas coincidan
40 correctamente para realizar una determinación exacta y una comparación de los puntos de fusión térmica para NprE. El efecto de la tasa de barrido en el punto de fusión térmica mostró asimismo una dependencia en los casos en los que el T_m dependía de la tasa de barrido hasta 150 °C/h y luego se nivelaba entre 150-200 °C/h. En función de dichos resultados, 200 °C/h se seleccionó como la tasa de barrido superior para todos los estudios para minimizar la dependencia del T_m de la tasa de barrido.

45

[0327] En la Tabla 4 se muestran los datos recopilados para NprE y las variantes. La Tabla 4 también incluye los puntos de fusión térmica por DSC obtenidos para NprE y variantes en presencia de 130 mM de citrato. En la mayoría de los casos, se barrieron dos concentraciones de proteínas. Como se indica en esta tabla, en el caso de los barridos en presencia de 130 mM de citrato, no todas las proteínas mostraron un perfil de despliegue
50 térmico.

Tabla 17. Resultados de DSC			
Enzima sometida a prueba	Concentración térmica por DSC		
	Concentración		
	220 ppm proteína	440 ppm proteína	440 ppm proteína con 130 mM citrato
NprE natural	67.6 +/- 0.5	69.2 +/-0.5	Sin transición
Termolisina	87.0000		52.1000
NprE de <i>B.subtilis</i>	68.0000		55.0000
FNA	64.9000		51.7000
T14R	57.0000		51.7000
S23K	67.8000		Ninguna
S23R	67.8000		53.5000
G24R	63.7000		50.7
Q45E	70.6000	70.7000	53.0000
N46K	63.8000		50.7
S58D	63.3000		50.5000
T59P	68.8000		49.1000
S58D,T60D	59.0000		Sin transición
T60D	66.2000		Sin transición
S66E	70.3000	71.6000	
S129I	70.2000	70.7000	50.3000
S 129V	69.9000	70.3000	Sin transición
F130L		69.8000	48.5000
M138I	69.2000		52.5000
M138L	67.8000		
V190I	69.0000	69.4000	51.5
L198M	68.2000	68.5000	53.3000
S199E	70.3000	70.3000	49.1000
D220P	69.3000	69.9000	49.4000
D220E	69.4000	69.8000	50.5000
K211V		69.8000	
K214Q		68.9000	
A221S	59.1000		52.5000
G222C	69.5000		Sin transición
K244S		67.6000	
K269T		69.5000	51.5
R280D	67.4000	67.9000	49.2000
N296E	60.5000	69.8000	49.5000
N50W, N296E		62.4000	47.2000
GSC, N61C	67.8000		48.4
Q45K, S199E		67.7000	51.3000
F130L, D220P	62.7000	70.3000	50.8000

Tabla 17. Resultados de DSC			
Enzima sometida a prueba	Concentración térmica por DSC		
	Concentración		
	220 ppm proteína	440 ppm proteína	440 ppm proteína con 130 mM citrato
M138L, D220P	63.2000	68.2000	50.8000
S129I, V190I		70.3000	55.8000
S129V, V190I		69.9000	55.3000
S129V, D220P		70.6000	55.7000
S129I, D220P		70.7000	53.5000
S129V, R280L		69.5000	54.9000
V190I, D220P		69.8000	52.8000
Q45K, S199E		67.7000	51.3000
N50W, N296E		62.4000	47.2000
G24K K269T D220E		65.0000	51.5000
S129I, F130L, D220P		68.9000	56.6000
nprE-T004S-S023N-G024M(+K269N)		64.6000	Ninguna
nprE-T004V-S023N		71.2000	49.0000
nprE-5023 W-G024Y		64.0000	Ninguna
nprE-T004V-S023 W-G024M		65.5000	49.3000
nprE-T059K-S66Q-S129I		70.5000	49.3000
nprE-T059R-S66N-S129I		70.2000	54.0000
nprE-T059R-S129I		69.4000	54.0000
nprE-T059K-S66Q-S129V		70.3000	56.0000

[0328] En la Figura 27 se muestra una figura representativa de los perfiles de despliegue térmico (barridos de DSC) para NprE natural y diversos mutantes de esta. Los perfiles de despliegue indican el punto medio natural y muestran mutantes seleccionados que presentan unos puntos de fusión térmica elevados en relación con la NprE natural y los que presentan unos puntos de fusión disminuidos en relación con la NprE natural. Esta figura destaca claramente que la DSC distinguía entre variantes de NprE estables y menos estables, y resulta de utilidad como cribado secundario. Se observa una tendencia general entre los puntos de fusión térmica de las variantes y su estabilidad en detergente. Por ejemplo, las variantes S66E, S 199E, D220P/E, S129I/N son todas ganadoras en TIDE® y presentan un aumento aproximado de 1 °C en el punto de fusión térmica en relación con la NprE natural. Este aumento de 1 °C en el punto de fusión térmica es pequeño pero significativo, ya que la estabilidad térmica normalmente necesita múltiples sustituciones de aminoácidos.

[0329] La Figura 28 muestra el despliegue térmico de variantes de NprE que presentan un perfil de despliegue térmico en presencia de 130 mM de citrato. El citrato es un componente de detergente que provoca rápidamente

la autólisis de NprE en ausencia de calcio. Para la NprE natural no hay un perfil de despliegue térmico en presencia de citrato, lo que resulta coherente con una proteína que ya está desplegada o que carece de un núcleo hidrófobo bien formado. Los mutantes que presentan un perfil de despliegue térmico en presencia de citrato se incluyen en la Tabla 17. Dichas variantes tienen puntos de fusión térmica en el intervalo de 47- 56 °C.

Los barridos de DSC en presencia de 130 mM de citrato indicaron variantes que son más estables frente al citrato que la NprE natural. Por ejemplo, las variantes estables frente al citrato se muestra que contienen S129I o S 129V y las combinaciones que contienen cualquiera de estas dos sustituciones muestran un aumento de + 5 °C en el punto de fusión térmica.

Efecto de los aditivos en los puntos de fusión térmica de NprE

[0330] La Figura 29 muestra los resultados de los experimentos que incluían diversos aditivos. El tampón fue 5 mM de HEPES, pH 8.0. Las muestras se analizaron de 20 - 100 °C por medio de una tasa de barrido de 200 °C/h. En esta figura, la línea horizontal representa el T_m para NprE natural sin aditivos. En dichos experimentos, los datos mostraron un efecto nulo o escaso en el punto de fusión térmica (T_m) de NprE en presencia de dichos reactivos. Se demostró que la inclusión de un inhibidor de la actividad de NprE, en concreto fosforamidón, aumentaba el T_m en aproximadamente 1 °C, lo que sugería que puede que el inhibidor ejerciera cierta estabilización a la NprE frente al proceso de despliegue térmico. Ninguna de las condiciones anteriormente mencionadas ayudó a revertir el proceso de despliegue térmico. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún mecanismo en concreto.

EJEMPLO 18

Estabilidad de homólogos de NprE en TIDE® y rendimiento de lavado de BMI de los homólogos

[0331] En este Ejemplo, se describen los experimentos realizados para evaluar la estabilidad de homólogos de NprE en TIDE®, así como el rendimiento de lavado de dichos homólogos. Se incubó NprE purificada («NprE»), NprE de *Bacillus subtilis* (NprE B.S.), NprB de *Bacillus thuringiensis* (NprB B.T.) y termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus* (TLN) en 200 µl de tide al 25 % en 10 mM de HEPES, pH 8 a 10 µg/ml a 25 °C durante 90 min. Las actividades iniciales y las actividades restantes se midieron por medio del ensayo AGLA, del modo descrito anteriormente. En pocas palabras, se añadieron 10 µl de muestra a 200 µl de tampón AGLA (50 mM de MES, pH 6.5, TWEEN®-80 al 0.005 %, 2.5 mM de CaCl₂), a continuación se añadieron 10 µl de muestra diluida a 200 µl de sustrato AGLA (2.4 mM de Abz-AGLA-Nba en tampón AGLA). Se supervisó la excitación a 350 nm y la emisión a 415 nm durante los primeros 100 segundos, la pendiente inicial se registró como actividad enzimática. El tanto por ciento de actividad restante se calculó al dividir la actividad restante entre la actividad inicial. La Figura 30 proporciona un gráfico que muestra la actividad restante tras 90 minutos.

[0332] Para determinar el rendimiento de lavado de estos homólogos en TIDE®, se añadió en primer lugar una micromuestra de BMI lavada previamente a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 190 µl de 1x TIDE® compacto (780 µg/ml de TIDE® compacto, 5 mM de HEPES, pH 8, 6 gpg/105 ppm de dureza del agua). A continuación, se añadieron 10 µl de NprE purificada, NprE de *Bacillus subtilis*, NprB de *Bacillus thuringiensis* y termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus* a los pocillos para producir una concentración enzimática final de 0.25 µg/ml. La placa se incubó a 25 °C durante 30 min con agitación a 1400 rpm sobre un termomezclador. Al finalizar la incubación, 100 µl de sobrenadante se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos. A continuación, se midió la DO a 405 nm de sobrenadante. La DO de sobrenadante se restó con la DO de un ensayo en blanco sin adición de enzimas. El índice de rendimiento se calculó al dividir la DO de cada homólogo entre la DO de NprE. La Figura 31 proporciona un gráfico que muestra el rendimiento de lavado de BMI de nprE, así como de los homólogos de nprE descritos en la presente memoria.

EJEMPLO 19

Análisis de metales de nprE natural y sus variantes

[0333] En este Ejemplo, se describen los experimentos realizados para determinar el contenido de cinc y calcio de nprE y variantes de nprE. En estos experimentos, se llevaron a cabo análisis de metales traza totales por medio de una espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICPMS) y una emisión de rayos X inducidos por partículas con un haz microcentrado (micro-PIXE) para confirmar el contenido de cinc y calcio de NprE. En general, un ión de cinc y dos iones de calcio están unidos firmemente.

[0334] Todas las muestras de ICPMS y micro-PIXE se prepararon en un tampón libre de metales para eliminar cualquier contaminante metálico exógeno. Normalmente, 250 µl de 40 mg/mL de muestras de NprE fueron cambiadas de tampón tres veces con 20 mM de HEPES, pH 8.2 mediante un aparato de microdiálisis YM-10. El tampón libre de metales se generó al pasar el tampón por una columna provista de resina Chelax 100. La

concentración de proteínas final se determinó por medio del kit de ensayo de determinación de la proteína de ácido bicinonínico (ensayo BCA) de Sigma. Las muestras de ICPMS se analizaron en West Coast Analytical Services, Inc. Las muestras de micro-PIXE se analizaron en el Ion Beam Analysis Laboratory.

- 5 [0335] La Tabla 19-1 muestra los resultados del análisis de metales por ICPMS para iones de calcio y cinc de NprE natural. En relación con la concentración de proteínas, se encontró la presencia de dos iones de calcio y dos iones de cinc en la muestra.

Tabla 19-1 Análisis de metales por ICPMS de NprE natural		
	Ca (ppm)	Zn (ppm)
ICPMS	73.8	156
Peso molecular (g/mol)	40.08	65.37
Proteína (ppm)	833	833
Relación/proteína	1.4*	1.9

- 10 [0336] El gráfico de análisis de composición elemental por MicroPIXE midió los contenidos de metal en relación con un estándar interno de proteínas. Todos los picos detectados por medio de Micro-PIXE se calcularon en relación con el pico de azufre proveniente de tres metioninas en el caso de NprE. Un gran pico observado de iones de cloruro se debió a la presencia de sal en el tampón.
- 15 [0337] La Tabla 18-2 muestra el contenido de metales determinado por Micro-PIXE, que indica que, en general, NprE contiene dos iones de calcio firmemente unidos y un ión de cinc por molécula proteica. La NprE natural mostró 1 ión de cinc con 2 iones de calcio. Se contempla que puede que los iones de calcio hayan mostrado una tasa de ocupación baja debido a la preparación de la muestra. S58D y T60D mostraron cerca de dos iones de cinc por proteína, lo que indicaba que hubiera un posible ión de cinc adicional unido al sitio. La variante doble
- 20 presenta dos cisteínas añadidas que contribuyen a la exactitud de la técnica. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna forma de realización en concreto con un número específico de iones.

Tabla 19-2. Determinación de metales por Micro-PIXE que muestra contenidos de Ca y Zn para NprE nativa y variantes						
	n. ° S	Ca/S	Ca/prot	Zn/S	Zn/prot	Ca/Zn
S58D	3	0.72	2.2	0.52	1.6	1.4
T60D	3	0.68	2.0	0.57	1.7	1.2
S58D.T60D	5	0.41	2.1	0.22	1.1	1.9
N46K	3	0.59	1.8	0.42	1.3	1.4
S23K	3	0.62	1.9	0.33	1.0	1.9
A221S	3	0.76	2.3	0.5	1.5	1.5
Natural	3	0.54	1.6	0.34	1.0	1.6

- 25 [0338] De manera coherente con otras proteasas neutras bien caracterizadas dependientes de calcio y cinc como termolisina o proteasas similares a la termolisina (TLP) (véase, por ejemplo, Dahlquist *et al.*, *Biochem.*, 15:1103-1111 [1976]; Springman *et al.*, (1995) *Biochemistry* 34, 15713-15720 [1995]; y Willenbrock *et al.*, (1995) *FEBS Lett.* 358:189-192), se observó que NprE contenía al menos dos iones de calcio unidos firmemente y un ión de cinc por molécula. Se sugiere un tercer sitio de unión a calcio potencial, pero se espera que sea muy débil. Dado que todas las muestras se desalaron para eliminar cualquier metal exógeno, se espera que dichos sitios de
- 30 calcio de unión débil no estén ocupados.

EJEMPLO 20**Estabilización de NprE con formiato cálcico en detergente compacto HDL TIDE®**

[0339] En este Ejemplo se describen los experimentos realizados para desarrollar medios de estabilización de NprE en detergente compacto HDL TIDE®. En estos experimentos, se investigaron los medios para estabilizar NprE al aumentar el nivel de formiato cálcico a una concentración fija de citrato al tiempo que se disminuye el contenido de DTPA en una formulación experimental de TIDE® compacto («TIDE® 2x»). Se usó una metodología estadística de diseño de experimentos (DOE) para simplificar los experimentos así como los análisis de datos. Se demostró que la presencia de DTPA en TIDE® afecta de manera negativa a la estabilidad de NprE, mientras que la adición de formiato cálcico ayuda a contrarrestar el efecto perjudicial en la formulación pura de TIDE® compacto.

[0340] Se usó como método DOE un modelo completo de superficie de respuesta con un diseño compuesto central con duplicación de puntos centrales. Se realizaron previamente un total de 16 formulaciones únicas variando cuatro componentes, de acuerdo con las variaciones de composición enumeradas en la Tabla 19.1. LAS varió de 0 – 6 % (p/p) con DTPA (0 - 0.25 %) y formiato cálcico (0 - 0.2 %) a una concentración fija de ácido cítrico (1.9 %). El resto de componentes del detergente TIDE® se mantuvieron constantes. Las condiciones límite de concentración de componentes se determinaron en función de la estabilidad de fase de las diversas mezclas. Las pruebas de estabilidad de proteínas se realizaron con 780 ppm de nprE en las mezclas de formulación puras (~100 %) y se incubaron a 32 °C. La inactivación se midió hasta 24 horas. Todos los ensayos se realizaron por medio del kit de ensayo de caseína marcada con rojo fluorescente (Invitrogen) con 0.5 ppm de concentración de proteínas. Las tasas de inactivación de NprE se midieron en tres experimentos independientes. Los datos de DOE se analizaron por medio de DOE Fusion Pro (S-Matrix).

Tabla 20.1. Composición de las 16 formulaciones de TIDE® usadas para los estudios de DOE				
	HLAS	Ácido cítrico	DTPA	Formiato de Ca
Form. 1	3	1.9	0	0.1
Form. 2	3	1.9	0.125	0.1
Form. 3	3	1.9	0.25	0.1
Form. 4	6	1.9	0.25	0.2
Form. 5	0	1.9	0	0.2
Form. 6	6	1.9	0	0.2
Form. 7	0	1.9	0.25	0.2
Form. 8	6	1:9	0.125	0.1
Form. 9	6	1.9	0.25	0
Form. 10	0	1.9	0.125	0.1
Form. 11	6	1.9	0	0
Form. 12	3	1.9	0.125	0
Form. 13	0	1.9	0.25	0
Form. 14	3	1.9	0.125	0.1
Form. 15	0	1.9	0	0
Form. 16	3	1.9	0.125	0.2

[0341] La Tabla 20.2 y la Figura 31 muestran los resultados de las medidas de estabilidad de NprE en diversas mezclas de formulaciones. Las tasas medias y la desviación típica fueron la tasa de inactivación de NprE (hora⁻¹) media de tres medidas independientes. Cualitativamente, las formulaciones con un bajo contenido de DTPA con una alta carga de calcio tienden a ser más estables en el TIDE® compacto puro. A modo de ejemplo, la Formulación 5, sin adición de DTPA y un alto nivel de formiato cálcico mostró la tasa de inactivación más baja de todas, lo que indicó una alta estabilidad de NprE. Por el contrario, la Formulación 9, con una alta concentración de DTPA y sin añadir formiato cálcico mostró la estabilidad más baja de todas. En la Tabla 20.2, la clasificación se basa en la estabilidad medida (es decir, las tasas medias). Las medidas provienen de tres experimentos de estabilidad independientes.

Tabla 20.2. Tasas de inactivación de NprE en 16 mezclas de formulaciones						
	Clasif.	Med. 1	Med. 2	Med. 3	Tasa media (hora ⁻¹)	Desviación típica
Form. 5	1	0.031	0.053	0.067	0.050	0.019
Form. 1	2	0.060	0.044	0.081	0.062	0.019
Form. 15	3	0.050	0.079	0.060	0.063	0.015
Form. 6	4	0.312	0.057	0.059	0.143	0.147
Form. 7	5	0.364	0.254	0.128	0.249	0.118
Form. 11	6	0.099	0.288	0.395	0.261	0.150
Form. 10	7	0.337	0.238	0.226	0.267	0.061
Form. 16	8	0.063	0.593	0.188	0.281	0.277
Form. 2	9	0.392	0.372	0.296	0.354	0.051
Form. 14	10	0.387	0.451	0.269	0.369	0.093
Form. 4	11	0.665	0.333	0.336	0.445	0.191
Form. 8	12	0.682	0.554	0.378	0.538	0.153
Form. 3	13	0.864	0.440	0.389	0.566	0.261
Form. 13	14	1.417	0.931	0.964	1.104	0.272
Form. 12	15	1.005	1.620	1.029	1.218	0.349
Form. 9	16	0.875	2.099	0.694	1.223	0.764

[0342] La Figura 33 muestra los efectos de inactivación de NprE por DTPA a diversos niveles de una concentración fija de formiato cálcico. El Gráfico A muestra la tasa de inactivación de NprE por DTPA sin adición de formiato cálcico. La correlación muestra que DTPA presenta un efecto perjudicial significativo. El Gráfico B muestra algo de disminución del efecto de DTPA con 0.1 % de formiato cálcico. El Gráfico C muestra una disminución significativa del efecto de DTPA con 0.2 % de formiato cálcico.

[0343] La Figura 34 muestra un perfil de predicción generado por el *software* de análisis de DOE (Fusion Pro) de la composición de DTPA y formiato cálcico en función de un objetivo de respuesta (tasa de decrecimiento) inferior a 0.5 h⁻¹ (Gráfico A), 0.25 h⁻¹ (Gráfico B) y 0.05 h⁻¹ (Gráfico C). Las zonas sombreadas indican relaciones de composiciones de DTPA y formiato cálcico que se prevé que mostrarán estabilidad con una tasa de decrecimiento por debajo del objetivo establecido. Por ejemplo, 0.16 % de formiato cálcico en presencia de 0.04 % de DTPA proporcionará estabilidad a la NprE, con una tasa de decrecimiento inferior a 0.25 hora⁻¹, como se muestra en el Gráfico B de la Figura 34. Por otro lado, 0.08 % de formiato cálcico no puede mantener la estabilidad de la NprE, con una tasa de decrecimiento de al menos 0.25 hora⁻¹ en presencia de 0.16 % de DTPA.

EJEMPLO 21

Identificación de los puntos de autólisis inducidos por citrato para metaloproteasa neutra NprE de *B. amyloliquefaciens*

[0344] En este Ejemplo, se describen los métodos usados para evaluar la autólisis inducida por citrato de nprE natural y la variante recombinante de nprE (por ejemplo, variante de *B. subtilis*). En estos experimentos, se indujo la autólisis de la metaloproteasa neutra de *B. amyloliquefaciens* (natural y la variante recombinante expresada en *B. subtilis*) por medio de citrato de sodio (Sigma). El proceso de autólisis se controló al llevar a cabo la reacción a 4 °C en 25 mM de tampón MES, pH 6.5. En estos experimentos, se optimizó la autólisis de 0.4 mg/ml de NprE al variar o bien: (a) el tiempo de incubación (10-100 minutos) en 10 mM de citrato; o (b) la concentración de citrato (10-100 de mM) pasados los 100 minutos. Se incubó un control de metaloproteasa neutra diluido solo en tampón (es decir, sin citrato) en condiciones similares. Se puso fin a las reacciones autolíticas al añadir un volumen igual de 1N de HCl, las muestras se precipitaron por medio de TCA y el sedimento se lavó y secó mediante acetona. El sedimento resultante se volvió a suspender en 20 µL de tampón, pH 6.5 y tampón de muestra 4X LDS (NuPage, Invitrogen).

[0345] Los fragmentos autolíticos se separaron por medio de SDS-PAGE al 10 % (p/v) y se transfirieron por electrotransferencia a una membrana de PVDF. Los 10 primeros residuos de aminoácidos se secuenciaron por degradación de Edman (Argo Bioanalytica). Se determinaron las secuencias de aminoácidos parciales de los fragmentos autolíticos por medio de digestión en gel con tripsina y se analizaron mediante EM-LCQ (Agilent). El

proceso de digestión en gel implicó la maceración de la pieza de gel que contenía la proteína, la eliminación de la mancha de azul de Coomassie seguido de la rehidratación de las piezas de gel en 25 mM de NH_4CO_3 que contenían 2 M de urea. Se añadió tripsina a las piezas de gel rehidratadas durante aprox. 6 horas a 37 °C. Tras la digestión, se extrajeron los péptidos mediante acetonitrilo y TCA. Los péptidos se separaron en una columna hidrófoba C4 (Vydac) por medio de un gradiente de acetonitrilo y agua. Los mapas peptídicos resultantes se buscaron con el programa de búsqueda de la base de datos REQUEST® y se cotejaron con una base de datos que contenía enzimas Genencor.

[0346] Las secuencias de aminoácidos de los 10 primeros aminoácidos de cada uno de los fragmentos se compararon con la secuencia de aminoácidos conocida para NprE de *B. amyloliquefaciens*. Ello permitió la identificación del aminoácido en los extremos N-terminales y de ahí se explica el/los sitio(s) de corte.

[0347] La generación de los fragmentos inducidos por citrato y su separación se mostraron en SDS-PAGE al 10 %. Se identificaron los tamaños de los fragmentos por medio de un marcador estándar de peso molecular de Invitrogen. En presencia de 10 mM de citrato, se observaron dos fragmentos, además de la NprE que permaneció intacta, por encima del intervalo de tiempo de los 100 minutos. Se encontró que el tamaño de los dos fragmentos formados en la concentración baja de citrato era de 24 kDa y 9 kDa. La nprE intacta es de 32 kDa. El intervalo de tiempo de los 100 minutos da lugar a una buena proporción de proteína cortada (es decir, los fragmentos de autólisis primaria). No se observaron ni detectaron fragmentos adicionales en dichas condiciones. Se llevó a cabo un estudio por encima de los 100 minutos en presencia de concentraciones cada vez mayores de citrato para obtener los fragmentos de autólisis secundaria. En este experimento, cuando se usaron concentraciones de entre 10 - 30 mM de citrato, se observaron los dos fragmentos descritos anteriormente. Con 40 mM de citrato, fue aparente un número menor de los fragmentos más grandes de 24-kDa, aunque también fue aparente un fragmento de 15-kDa. Entre 50 - 100 mM de citrato, ya no se detectó el fragmento de 24 kDa ni los fragmentos de 9-kDa, aunque se observaron otros tres fragmentos de tamaños 21 kDa, 15 kDa y 11 kDa.

[0348] Se determinó la identidad de los extremos N-terminales de los fragmentos de 24 kDa, 9 kDa (los dos primeros fragmentos) y la de los fragmentos de 21 kDa, 15 kDa y 11 kDa (los siguientes fragmentos autolíticos) por medio de la degradación de Edman (Argo Bioanalytica).

Tabla 21. Secuencia de extremo N-Terminal de fragmentos		
Nombre muestra	Secuencia de aminoácidos N-terminal (5'-3') (SEQ ID NO:)	Peso molecular correspondiente en SDS-PAGE (kDa)
Banda A1	AATTGTGTTL (SEQ ID NO:215)	24
Banda A2	DAGDYGGVHT (SEQ ID NO:216)	9
	AGDYGGVHTN (SEQ ID NO:217)	
	GDYGGVHTN (SEQ ID NO:218)	
Banda A3	AATTGTGTTL (SEQ ID NO:219)	21
Banda A4	AATTGTGTTL (SEQ ID NO:220)	15
Banda A5	LSNPTKYGQP (SEQ ID NO:221)	11

[0349] Las Bandas A1, A3 y A4 presentan la secuencia N-terminal nativa que coincide con el extremo N-terminal de la NprE intacta. El informe de secuenciación de la Banda A2 mostró tres fragmentos en los que la secuencia menos intensa parecía ser idéntica a la secuencia más intensa, con la salvedad de que eran dos residuos y un residuo más corto que las secuencias más intensas, respectivamente. Ello era coherente con un desgaste de dicho fragmento de proteína en concreto. El patrón y el tamaño de los fragmentos de gel sugieren que el fragmento de 15 kDa (Banda A4) puede que se derive del fragmento de 21-kDa (Banda A3) y de ahí se deduce que el extremo C-terminal se encuentra en la posición 198 o cerca de esta. No obstante, no se pretende que la presente invención esté limitada por esta forma de realización en concreto.

[0350] La Figura 35 proporciona las secuencias de aminoácidos de los diversos fragmentos (1-5 o A1-5 a efectos de la secuenciación N-terminal). Los residuos N-terminales del fragmento 1 (A1) equivalen a los de la proteína nativa intacta (SEQ ID NO:222), el extremo N-terminal del fragmento 2 (Ad2) comienza en D220 o cerca de dicha posición (SEQ ID NO:223). También se destacan los dos residuos de aminoácidos siguientes (A221 y G222) porque este fragmento se identificó como en proceso de desgaste. El fragmento 3 (A3) (SEQ ID NO:224) y el fragmento 4 (A4) (SEQ ID NO:225) presentan el extremo N-terminal de la proteína intacta, y el fragmento 5 (A5) (SEQ ID NO:226) comienza en L198. Es probable que el extremo C-terminal del fragmento 4 se encuentre en M138 o cerca de dicha posición (en función de la diferencia de tamaño entre A3 y A4). No se detectó el fragmento correspondiente para A3.

[0351] La digestión con tripsina seguida de EM-LCQ de los mapas peptídicos para los fragmentos del 1 al 5 identificó de manera positiva varios péptidos de aminoácidos en los respectivos fragmentos. Estos se destacan en la Figura 35. La EM-LCQ ofreció un control positivo para la identificación de los fragmentos.

5 [0352] En función del extremo N-terminal y el análisis EM-LCQ de los fragmentos de corte, los sitios de corte primarios se identificaron en las posiciones de aminoácidos D220, A221, G222, M138 y L198. Estos sitios se localizaron por medio de mutagénesis dirigida y se crearon genotecas de evaluación del sitio de D220, A221, G222, L198 y M138, D139. Se cribaron las proteínas mutantes en busca de un aumento de la estabilidad en detergente y de un rendimiento de lavado de BMI, como se indica en la presente memoria. En algunos casos, también se seleccionaron los aminoácidos a lo largo de dichos sitios para ingeniería de proteínas, con el objetivo de garantizar que el sitio de corte se había localizado de hecho.

10 [0353] Los resultados de ingeniería de proteínas indicaron claramente que las sustituciones de aminoácidos de Pro o Glu en D220 generaron una molécula de NprE que es más estable en detergente. Además, se le confirió una estabilidad adicional a la molécula de NprE al sustituir G222 con Cys y M138 con o Ile o Leu. En general, estas sustituciones de aminoácidos específicas dotaron a la NprE de ventajas en relación a la estabilidad del detergente sin comprometer el rendimiento de lavado de BMI. Por tanto, estos experimentos proporcionan importantes datos de cartografía para los sitios de autólisis inducida por citrato, lo que facilita la identificación de residuos de aminoácidos clave que alteran y afectan a la estabilidad global de NprE. El citrato (que es un adyuvante que se añade a las matrices de detergente) desestabiliza y realiza la autólisis de NprE, y se sugiere que lo hace al quelatar los átomos esenciales unidos a calcio. La aplicación de NprE en condiciones de detergentes agresivos exige que se utilice una molécula de NprE más estable en dichas situaciones. En estos experimentos, las sustituciones de uno o varios de los sitios de autólisis de NprE ha dado lugar a una molécula de nprE más estable respecto al detergente para su uso en estos detergentes agresivos.

EJEMPLO 22

Composiciones detergentes líquidas para ropa

25 [0354] En este Ejemplo, se proporcionan diversas formulaciones para composiciones detergentes líquidas para ropa. Se preparan las siguientes composiciones detergentes líquidas para ropa de la presente invención:

Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
LAS	24.0	32.0	6.0	3.0	6.0
HSAS NaC ₁₆ -C ₁₇	-	-	-	5.0	-
AE _{1.8} S C ₁₂ -C ₁₅	-	-	8.0	7.0	5.0
Propildimetilamina C ₈ -C ₁₀	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
Óxido de alquildimetilamina C ₁₂ -C ₁₄	-	-	-	-	2.0
AS C ₁₂ -C ₁₅	-	-	17.0	-	8.0
CFAA	-	5.0	4.0	4.0	3.0
Alcoholetoxilato graso C ₁₂ -C ₁₄	12.0	6.0	1.0	1.0	1.0
Ácido graso C ₁₂ -C ₁₈	3.0	-	4.0	2.0	3.0
Ácido cítrico (anhidro)	4.5	5.0	3.0	2.0	1.0
DETPMP	-	-	1.0	1.0	0.5
Monoetanolamina	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0
Hidróxido sódico	-	-	2.5	1.0	1.5
1 N de solución acuosa de HCl	#1	#1	-	-	-
Propanodiol	12.7	14.5	13.1	10.	8.0
Etanol	1.8	2.4	4.7	5.4	1.0
DTPA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
Pectina liasa	-	-	-	0.005	-
Amilasa	0.001	0.002	-		-
Celulasa	-	-	0.0002		0.0001
Lipasa	0.1	-	0.1	-	0.1

Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
nprE	0.05	0.3	-	0.5	0.2
PMN	-	-	0.08	-	-
Proteasa A	-	-	-	-	0.1
Aldosa oxidasa	-	-	0.3	-	0.003
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.05	0.05	0.02
Formiato de Ca	0.05	0.07	0.05	0.06	0.07
DETBCHD	-	-	0.02	0.01	-
SRP1	0.5	0.5	-	0.3	0.3
Ácido bórico	-	-	-	-	2.4
Xilenosulfonato de sodio	-	-	3.0	-	-
Cumenosulfato de sodio	-	-	-	0.3	0.5
DC 3225C	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2-butiloctanol	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
Blanqueador 1	0.12	0.10	0.18	0.08	0.10
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua					
#1: Añadir 1N de solución acuosa de HCl para ajustar el pH puro de la fórmula en el intervalo de 3 aproximadamente a 5 aproximadamente.					

[0355] El pH de los Ejemplos anteriores 22(I)-(II) es de 5 aproximadamente a 7 aproximadamente, y de 22(III)-(V) es de aproximadamente 7.5 a 8.5 aproximadamente.

EJEMPLO 23

5 Composiciones detergentes líquidas de lavavajillas a mano

[0356] En este Ejemplo, se proporcionan diversas formulaciones de detergente líquidas de lavavajillas a mano. Las siguientes son composiciones detergentes líquidas de lavavajillas a mano de la presente invención:

Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
AE _{1.8} S C ₁₂ -C ₁₅	30.0	28.0	25.0	-	15.0	10.0
LAS	-	-	-	5.0	15.0	12.0
Sulfonato de parafina	-	-	-	20.0	-	-
Óxido de alquildimetilamina C ₁₀ -C ₁₈	5.0	3.0	7.0	-	-	-
Betaína	3.0,	-	1.0	3.0	1.0	-
Amida de ácido graso poli-OH C ₁₂	-	-	-	3.0	-	1.0
Amida de ácido graso poli-OH C ₁₄	-	1.5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2.0	-	4.0	-	-	20.0
DTPA	-	-	-	-	0.2	-
Citrato de trisodio dihidratado	0.25	-	-	0.7	-	-
Diamina	1.0	5.0	7.0	1.0	5.0	7.0
MgCl ₂	0.25	-	-	1.0	-	-
nprE	0.02	0.01	-	0.01	-	0.05
PMN	-	-	0.03	-	0.02	-
Proteasa A	-	0.01	-	-	-	-

Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
Amilasa	0.001	-	-	0.002	-	0.001
Aldosa oxidasa	0.03	-	0.02	-	0.05	-
Cumenosulfato de sodio	-	-	-	2.0	1.5	3.0
PAAC	0.01	0.01	0.02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.01	0.02	0.01
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua						

[0357] El pH de los Ejemplos 23(I)-(VI) es de 8 aproximadamente a 11 aproximadamente.

EJEMPLO 24

Composiciones detergentes líquidas de lavavajillas automático

- 5 [0358] En este Ejemplo, se proporcionan diversas formulaciones de detergente líquidas de lavavajillas automático. Las siguientes son composiciones detergentes líquidas de lavavajillas a mano de la presente invención:

Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
Sulfato de potasio	-	10	8	-	10
1,2 propanodiol	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5
Ácido bórico	-	-	-	4.0	3.0
CaCl ₂ dihidratado	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
No iónico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
nprE	0.1	0.03	-	0.03	-
PMN	-	-	0.05	-	0.06
Proteasa B	-	-	-	0.01	-
Amilasa	0.02	-	0.02	0.02	-
Aldosa oxidasa	-	0.15	0.02	-	0.01
Galactosa oxidasa	-	-	0.01	-	0.01
PAAC	0.01	-	-	0.01	-
DETBCHD	-	0.01	-	-	0.01
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua					

EJEMPLO 25

- 10 Composiciones para ropa en forma granulada y/o de pastilla

[0359] Este Ejemplo proporciona diversas formulaciones para detergentes para ropa en forma granulada y/o de pastilla. Se preparan las siguientes composiciones para ropa de la presente invención, que puede que estén en forma de gránulos o de pastilla.

Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
Producto básico					
AS C ₁₄ -C ₁₅ o TAS	8.0	5.0	3.0	3.0	3.0
LAS	8.0	-	8.0	-	7.0
AE ₃ S C ₁₂ -C ₁₅	0.5	2.0	1.0	-	-

Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
Producto básico					
E ₅ o E ₃ C ₁₂ -C ₁₅	2.0	-	5.0	2.0	2.0
QAS	-	-	-	1.0	1.0
Zeolita A	20.0	18.0	11.0	-	10.0
SKS-6 (adición en seco)	-	-	9.0	-	-
MA/AA	2.0	2.0	2.0	-	-
AA	-	-	-	-	4.0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	-	2.0	-	-	-
Ácido cítrico (anhidro)	2.0	-	1.5	2.0	-
DTPA	0.2	0.2	-	-	-
EDDS	-	-	0.5	0.1	-
HEDP	-	-	0.2	0.1	-
PB1	3.0	4.8	-	-	4.0
Percarbonato	-	-	3.8	5.2	-
NOBS	1.9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2.0	-	-
TAED	0.5	2.0	2.0	5.0	1.00
BB1	0.06	-	0.34	-	0.14
BB2	-	0.14	-	0.20	-
Carbonato de Na anhidro	15.0	18.0	-	15.0	15.0
Sulfato	5.0	12.0	5.0	17.0	3.0
Silicato	-	1.0	-	-	8.0
nprE	0.03	-	0.1	0.06	-
PMN	-	0.05	-	-	0.1
Proteasa B	-	0.01	-	-	-
Proteasa C	-	-	-	0.01	-
Lipasa	-	0.008	-	-	-
Amilasa	0.001	-	-	-	0.001
Celulasa	-	0.0014	-	-	-
Pectina liasa	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Aldosa oxidasa	0.03	-	0.05	-	-
PAAC	-	0.01	-	-	0.05
Resto hasta 100 % humedad y/o productos minoritarios*					
* Perfume, tinte, blanqueador / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na/ fotoblanqueante/ MgSO ₄ / PVPVI/ supresor de jabonaduras /PEG de alto peso molecular/arcilla.					

EJEMPLO 26**Detergentes líquidos para ropa**

- 5 **[0360]** Este Ejemplo proporciona diversas formulaciones para detergentes líquidos para ropa. Se preparan las siguientes formulaciones de detergente líquido para ropa:

Compuesto	Formulaciones					
	I	I	II	III	IV	V
LAS	11.5	11.5	9.0	-	4.0	-
AE _{2.85} S C ₁₂ -C ₁₅	-	-	3.0	18.0	-	16.0
E 2.5 S C ₁₄ -C ₁₅	11.5	11.5	3.0	-	16.0	-
E ₉ C ₁₂ -C ₁₃	-	-	3.0	2.0	2.0	1.0
E ₇ C ₁₂ -C ₁₃	3.2	3.2	-	-	-	-
CFAA	-	-	-	5.0	-	3.0

Compuesto	Formulaciones					
	I	I	II	III	IV	V
TPKFA	2.0	2.0	-	2.0	0.5	2.0
Ácido cítrico (anhidro)	3.2	3.2	0.5	1.2	2.0	1.2
Formiato de Ca	0.1	0.1	0.06	0.1	-	-
Formiato de Na	0.5	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.06	0.03	0.05	0.05
Culmenosulfonato de Na	4.0	4.0	1.0	3.0	1.2	-
Borato	0.6	0.6	1.5	-	-	-
Hidróxido de Na	6.0	6.0	2.0	3.5	4.0	3.0
Etanol	2.0	2.0	1.0	4.0	4.0	3.0
1,2 Propanodiol	3.0	3.0	2.0	8.0	8.0	5.0
Monoetanolamina	3.0	3.0	1.5	1.0	2.5	1.0
TEPAE	2.0	2.0	-	1.0	1.0	1.0
nprE	0.03	0.05	-	0.03	-	0.02
PMN	-	-	0.01	-	0.08	-
Proteasa A	-	-	0.01	-	-	-
Lipasa	-	-	-	0.002	-	-
Amilasa	-	-	-	-	0.002	-
Celulasa	-	-	-	-	-	0.0001
Pectina liasa	0.005	0.005	-	-	-	-
Aldosa oxidasa	0.05	-	-	0.05	-	0.02
Galactosa oxidasa	-	0.04	-	-	-	-
PAAC	0.03	0.03	0.02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.02	0.01	-
SRP 1	0.2	0.2	-	0.1	-	-
DTPA	-	-	-	0.3	-	-
PVNO	-	-	-	0.3	-	0.2
Blanqueador 1	0.2	0.2	0.07	0.1	-	-
Antiespumante de silicona	0.04	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua						

EJEMPLO 27**Detergentes lavavajillas de alta densidad**

[0361] Este Ejemplo proporciona diversas formulaciones para detergentes lavavajillas de alta densidad. Se preparan los siguientes detergentes lavavajillas compactos de alta densidad de la presente invención:

5

Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45.0	45.0	-	-	40.0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	17.0	-	-	50.0	40.2	-
Carbonato de Na	17.5	14.0	20.0	-	8.0	33.6
Bicarbonato	-	-	-	26.0	-	-
Silicato	15.0	15.0	8.0	-	25.0	3.6

Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
Metasilicato	2.5	4.5	4.5	-	-	-
PB1	-	-	4.5	-	-	-
PB4	-	-	-	5.0	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	-	4.8
BB1	-	0.1	0.1	-	0.5	-
BB2	0.2	0.05	-	0.1	-	0.6
No iónico	2.0	1.5	1.5	3.0	1.9	5.9
HEDP	1.0	-	-	-	-	-
DETPMP	0.6	-	-	-	-	-
PAAC	0.03	0.05	0.02	-	-	-
Parafina	0.5	0.4	0.4	0.6	-	-
nprE	0.072	0.053	-	0.026	-	0.01
PMN	-	-	0.053	-	0.059	-
Proteasa B	-	-	-	-	-	0.01
Amilasa	0.012	-	0.012	-	0.021	0.006
Lipasa	-	0.001	-	0.005	-	-
Pectina liasa	0.001	0.001	0.001	-	-	-
Aldosa oxidasa	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01
BTA	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
Policarboxilato	6.0	-	-	-	4.0	0.9
Perfume	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
Resto hasta 100 % humedad y/o productos minoritarios*						
*Blanqueador / tinte / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na/ fotoblanqueante/ MgSO ₄ / PVPVI/ supresor de jabonaduras /PEG de alto peso molecular/arcilla.						

[0362] El pH de los Ejemplos 27 (I) a (VI) es de 9.6 aproximadamente a 11.3 aproximadamente.

EJEMPLO 28

Composiciones detergentes en pastillas

- 5 [0363] Este Ejemplo proporciona diversas formulaciones de detergente en pastillas. Se preparan las siguientes composiciones detergentes en pastillas de la presente invención por medio de la compresión de una composición detergente de lavavajillas granulado a una presión de 13KN/cm² mediante una prensa rotativa de 12 cabezales estándar:

Compuesto	Formulaciones							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48.8	44.7	38.2	-	42.4	46.1	46.0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	20.0	-	-	-	35.9	-	-	-
Carbonato de Na	20.0	5.0	14.0	15.4	8.0	23.0	20.0	-
Silicato	15.0	14.8	15.0	12.6	23.4	2.9	4.3	4.2
Lipasa	0.001	-	0.01	-	0.02	-	-	-
Proteasa B	0.01	-	-	-	-	-	-	-
Proteasa C	-	-	-	-	-	0.01	-	-
nprE	0.01	0.08	-	0.04	-	0.023	-	0.05
PMN	-	-	0.05	-	0.052	-	0.023	-

Compuesto	Formulaciones							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Amilasa	0.012	0.012	0.012	-	0.015	-	0.017	0.002
Pectina liasa	0.005	-	-	0.002	-	-	-	-
Aldosa oxidasa	-	0.03	-	0.02	0.02	-	0.03	-
PB1	-	-	3.8	-	7.8	-	-	4.5
Percarbonato	6.0	-	-	6.0	-	5.0	-	-
BB1	0.2	-	0.5	-	0.3	0.2	-	-
BB2	-	0.2	-	0.5	-	-	0.1	0.2
No iónico	1.5	2.0	2.0	2.2	1.0	4.2	4.0	6.5
PAAC	0.01	0.01	0.02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.02	0.02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2.1	-	1.6
HEDP	1.0	-	-	0.9	-	0.4	0.2	-
DETPMP	0.7	-	-	-	-	-	-	-
Parafina	0.4	0.5	0.5	0.5	-	-	0.5	-
BTA	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	-
Policarboxilato	4.0	-	-	-	4.9	0.6	0.8	-
PEG 400-30 000	-	-	-	-	-	2.0	-	2.0
Glicerol	-	-	-	-	-	0.4	-	0.5
Perfume	-	-	-	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2
Resto hasta 100 % humedad y/o productos minoritarios*								
*Blanqueador / SRP / carboximetilcelulosa de Na/ fotoblanqueante/ MgSO ₄ / PVPVI/ supresor de jabonaduras /PEG de alto peso molecular/arcilla.								

[0364] El pH de los Ejemplos 28(I) a 28 (VII) es de 10 aproximadamente a 11.5 aproximadamente; el pH de 15 (VIII) es de 8-10. El peso de las pastillas de los Ejemplos 28(I) a 28(VIII) es de 20 gramos aproximadamente a 30 gramos aproximadamente.

5 EJEMPLO 29

Detergentes líquidos de limpieza de superficies duras

[0365] Este Ejemplo proporciona diversas formulaciones para detergentes líquidos de limpieza de superficies duras. Se preparan las siguientes composiciones detergentes líquidas de limpieza de superficies duras de la presente invención:

Compuesto	Formulaciones						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
E ₅ C ₉ -C ₁₁	2.4	1.9	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
E ₅ C ₁₂ -C ₁₄	3.6	2.9	2.5	2.5	2.5	3.6	2.5
E ₆ C ₇ -C ₉	-	-	-	-	8.0	-	-
E ₂₁ C ₁₂ -C ₁₄	1.0	0.8	4.0	2.0	2.0	1.0	2.0
LAS	-	-	-	0.8	0.8	-	0.8
Culmenosulfonato de sodio	1.5	2.6	-	1.5	1.5	1.5	1.5
AS Isachem ®	0.6	0.6	-	-	-	0.6	-
Na ₂ O ₃	0.6	0.13	0.6	0.1	0.2	0.6	0.2
Citrato de 3Na 2H ₂ O	0.5	0.56	0.5	0.6	0.75	0.5	0.75
NaOH	0.3	0.33	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5

Compuesto	Formulaciones						
Ácido graso	0.6	0.13	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4
2-butiloctanol	0.3	0.3		0.3	0.3	0.3	0.3
PEG DME-2000®	0.4		0.3	0.35	0.5	-	-
PVP	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	-	-
MME PEG (2000) ®	-	-	-	-	-	0.5	0.5
Jeffamine® ED-2001	-	0.4	-	-	0.5	-	-
PAAC	-	-	-	0.03	0.03	0.03	-
DETBCHD	0.03	0.05	0.05	-	-	-	-
NprE	0.07	-	0.08	0.03	-	0.01	0.04
PMN	-	0.05	-	-	0.06	-	-
Proteasa B	-	-	-	-	-	0.01	-
Amilasa	0.12	0.01	0.01	-	0.02	-	0.01
Lipasa	-	0.001	-	0.005	-	0.005	-
Pectina liasa	0.001	-	0.001	-	-	-	0.002
ZnCl2	0.02	0.01	0.03	0.05	0.1	0.05	0.02
Formiato cálcico	0.03	0.03	0.01	-	-	-	-
PB1	-	4.6	-	3.8	-	-	-
Aldosa oxidasa	0.05	-	0.03	-	0.02	0.02	0.05
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua							

[0366] El pH de los Ejemplos 29(I) a (VII) es de 7.4 aproximadamente a 9.5 aproximadamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0367]

- 5 <110> Genencor International, Inc.
The Procter and Gamble Company
- <120> Uso y producción de metaloproteasa neutra estable en el almacenamiento
- 10 <130> GRF/FP6763833
- <140> Solicitud divisional del documento EP 06826175.9
- <141> 12-10-2006
- 15 <150> EP 06826175.9
- <151> 12-10-2006
- <150> PCT/US06/40695
- <151> 12-10-2006
- 20 <150> US 60/726.448
- <151> 12-10-2005
- <160> 226
- 25 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 713

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 1

5

gagctgggta	aagcctatga	attctccatt	ttcttctgct	atcaaaataa	cagactcgtg	60
atthtccaaa	cgagctttca	aaaaagcctc	tgccccttgc	aaatcggatg	cctgtctata	120
aaattcccga	tattgggtta	acagcggcgc	aatggcggcc	gcactctgat	tctttgcttg	180
gcgaatgttc	atcttatttc	ttctctccctc	tcaataattt	tttcatctta	tcccttttct	240
gtaaagttta	tttttcagaa	tactttttatc	atcatgcttt	gaaaaaatat	cacgataata	300
tccattgttc	tcacggaagc	acacgcaggt	catttgaacg	aattttttcg	acaggaattt	360
gccgggactc	aggagcattt	aacctaaaaa	agcatgacat	ttcagcataa	tgaacattta	420
ctcatgtcta	ttttcgttct	tttctgtatg	aaaatagtta	tttcgagctc	ctacggaaat	480
agcgagagat	gatataccta	aatagagata	aaatcatctc	aaaaaaatgg	gtctactaaa	540
atattattcc	atctattaca	ataaattcac	agaatagtct	tttaagtaag	tctactctga	600
atthttttta	aaggagaggg	ttaaagagtga	gaagcaaaaa	attgtggatc	agcttgttgt	660
ttgcgttaac	gttaatcttt	acgatggcgt	tcagcaacat	gtctgcgcag	gct	713

<210> 2

<211> 1578

10

<212> ADN

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 2

15

gctgagaatc	ctcagcttaa	agaaaacctg	acgaattttg	taccgaagca	ttctttggtg	60
caatcagaat	tgcttctgt	cagtgcacaa	gctatcaagc	aatacttgaa	acaaaacggc	120
aaagtcttta	aaggcaatcc	ttctgaaaga	ttgaagctga	ttgaccaaac	gaccgatgat	180
ctcggtctca	agcacttccg	ttatgtgcct	gtcgtaaacg	gtgtgcctgt	gaaagactct	240
caagtcattha	ttcacgtcga	taaatccaac	aacgtctatg	cgattaacgg	tgaattaaac	300
aacgatgttt	cgcgcaaaa	ggcaaacagc	aaaaaattat	ctgcaaatca	ggcgctggat	360
catgcttata	aagcgatcgg	caaatcacct	gaagccgttt	ctaacggaac	cgttgcaaac	420

aaaaacaaag	ccgagctgaa	agcagcagcc	acaaaagacg	gcaaataccg	cctcgccctat	480
gatgtaacca	tccgctacat	cgaaccggaa	cctgcacact	gggaagtaac	cgttgatgcg	540
gaaacaggaa	aaatcctgaa	aaagcaaaa	aaagtggagc	atgccgccac	aaccggaaca	600
ggtacgactc	ttaaaggaaa	aacggtctca	ttaaataatt	cttctgaaag	cggcaaatat	660
gtgtgcgcgc	atctttctaa	acctaccgga	acacaaatta	ttacgtacga	tctgcaaaa	720
cgcgagtata	acctgcgggg	cacactcgta	tccagcacca	caaaccagtt	tacaacttct	780
tctcagcgcg	ctgcgcttga	tgcgatttac	aacctcgga	aagtgtatga	ttatttctat	840
cagaagttha	atcgcaacag	ctacgacaat	aaagcgga	agatcgatc	ctccgttcat	900
tacggcagca	gatacaataa	cgcagcctgg	atcggcgacc	aaatgattta	cggtagcggc	960
gacggttcat	tcttctcacc	tctttccggg	tcaatggacg	taaccgctca	tgaatgaca	1020
catggcggtta	cacaggaaa	agccaacctg	aactacgaaa	atcagccggg	cgttttaaac	1080
gaatccttct	ctgatgtatt	cgggtacttc	aacgatactg	aggactggga	tatcggtgaa	1140
gatattacgg	tcagccagcc	ggctctccgc	agcttatcca	atccgacaaa	atacggacag	1200
cctgataatt	tcaaaaatta	caaaaacctt	cgaacactg	atgccggcga	ctacggcggc	1260
gtgcatacaa	acagcggaat	cccgaacaaa	gccgcttaca	atacattac	aaaaatcggc	1320
gtgaacaaag	cggagcagat	ttactatcgt	gctctgacgg	tatacctcac	tccgtcatca	1380
acttttaaa	atgcaaaagc	cgttttgatt	caatctgcgc	gggaccttta	cggctctcaa	1440
gatgctgcaa	gcgtagaagc	tgcttggaat	gcagtcggat	tgtaaacaa	aaaagagacc	1500
ggaaatccgg	tctctttttt	atatctaaaa	acatttcaca	gtggcttcac	catgatcata	1560
tatgtcaagc	ttgggggg					1578

<210> 3

20

<211> 520

<212> PRT

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 3

```

Met Gly Leu Gly Lys Lys Leu Ser Val Ala Val Ala Ala Ser Phe Met
1      5      10      15
Ser Leu Thr Ile Ser Leu Pro Gly Val Gln Ala Ala Glu Asn Pro Gln
20      25      30
Leu Lys Glu Asn Leu Thr Asn Phe Val Pro Lys His Ser Leu Val Gln
35      40      45
Ser Glu Leu Pro Ser Val Ser Asp Lys Ala Ile Lys Gln Tyr Leu Lys
50      55      60
Gln Asn Gly Lys Val Lys Gly Asn Pro Ser Glu Arg Leu Lys Leu Ile
65      70      75      80
Asp Gln Thr Thr Asp Asp Leu Gly Tyr Lys His Phe Arg Tyr Val Pro
85      90      95
Val Val Asn Gly Val Pro Val Lys Asp Ser Gln Val Ile Ile His Val
100      105      110
Asp Lys Ser Asn Asn Val Tyr Ala Ile Asn Gly Glu Leu Asn Asn Asp
115      120      125
Val Ser Ala Lys Thr Ala Asn Ser Lys Lys Leu Ser Ala Asn Gln Ala
130      135      140
Leu Asp His Ala Tyr Lys Ala Ile Gly Lys Ser Pro Glu Ala Val Ser
145      150      155      160
Asn Gly Thr Val Ala Asn Lys Asn Lys Ala Glu Leu Lys Ala Ala Ala
165      170      175
Thr Lys Asp Gly Lys Tyr Arg Leu Ala Tyr Asp Val Thr Ile Arg Tyr
180      185      190
Ile Glu Pro Glu Pro Ala Asn Trp Glu Val Thr Val Asp Ala Glu Thr
195      200      205
Gly Lys Ile Leu Lys Lys Gln Asn Lys Val Glu His Ala Ala Thr Thr
210      215      220
Gly Thr Gly Thr Thr Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser Leu Asn Ile Ser
225      230      235      240
Ser Glu Ser Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser Lys Pro Thr Gly
245      250      255
Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Glu Tyr Asn Leu Pro
260      265      270
Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Gln Phe Thr Thr Ser Ser Gln
275      280      285
Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys Val Tyr Asp Tyr
290      295      300
Phe Tyr Gln Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn Lys Gly Gly Lys
305      310      315      320
Ile Val Ser Ser Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn Asn Ala Ala Trp
325      330      335
Ile Gly Asp Gln Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Ser Phe Phe Ser
340      345      350
Pro Leu Ser Gly Ser Met Asp Val Thr Ala His Glu Met Thr His Gly
355      360      365
Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Asn Tyr Glu Asn Gln Pro Gly Ala
370      375      380
Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr Phe Asn Asp Thr Glu
385      390      395      400
Asp Trp Asp Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Gln Pro Ala Leu Arg
405      410      415
Ser Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Gln Pro Asp Asn Phe Lys Asn
420      425      430
Tyr Lys Asn Leu Pro Asn Thr Asp Ala Gly Asp Tyr Gly Gly Val His
435      440      445
Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn Lys Ala Ala Tyr Asn Thr Ile Thr Lys
450      455      460
Ile Gly Val Asn Lys Ala Glu Gln Ile Tyr Tyr Arg Ala Leu Thr Val
465      470      475      480
Tyr Leu Thr Pro Ser Ser Thr Phe Lys Asp Ala Lys Ala Ala Leu Ile
485      490      495
Gln Ser Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Gln Asp Ala Ala Ser Val Glu
500      505      510
Ala Ala Trp Asn Ala Val Gly Leu
515      520

```

<210> 4

<211> 523

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Homólogo de NpreE

<400> 4

5

Val	Arg	Ser	Lys	Lys	Leu	Trp	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Ala	Leu	Thr	Leu
1				5					10					15	
Ile	Phe	Thr	Met	Ala	Phe	Ser	Asn	Met	Ser	Ala	Gln	Ala	Ala	Glu	Asn
			20					25					30		
Pro	Gln	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Thr	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	His	Ser	Leu
		35					40					45			
Val	Gln	Ser	Glu	Leu	Pro	Ser	Val	Ser	Asp	Lys	Ala	Ile	Lys	Gln	Tyr
	50					55				60					
Leu	Lys	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Phe	Lys	Gly	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Leu
65					70					75				80	
Lys	Leu	Ile	Asp	Gln	Thr	Thr	Asp	Asp	Leu	Gly	Tyr	Lys	His	Phe	Arg
				85					90					95	
Tyr	Val	Pro	Val	Val	Asn	Gly	Val	Pro	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Val	Ile
			100					105					110		
Ile	His	Val	Asp	Lys	Ser	Asn	Asn	Val	Tyr	Ala	Ile	Asn	Gly	Glu	Leu
		115					120					125			
Asn	Asn	Asp	Val	Ser	Ala	Lys	Thr	Ala	Asn	Ser	Lys	Lys	Leu	Ser	Ala
	130					135					140				
Asn	Gln	Ala	Leu	Asp	His	Ala	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gly	Lys	Ser	Pro	Glu
145					150					155					160
Ala	Val	Ser	Asn	Gly	Thr	Val	Ala	Asn	Lys	Asn	Lys	Ala	Glu	Leu	Lys
				165					170					175	
Ala	Ala	Ala	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Arg	Leu	Ala	Tyr	Asp	Val	Thr
			180					185						190	
Ile	Arg	Tyr	Ile	Glu	Pro	Glu	Pro	Ala	Asn	Trp	Glu	Val	Thr	Val	Asp
		195					200					205			
Ala	Glu	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Lys	Val	Glu	His	Ala
	210					215					220				
Ala	Thr	Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Leu	Lys	Gly	Lys	Thr	Val	Ser	Leu
225					230					235					240
Asn	Ile	Ser	Ser	Glu	Ser	Gly	Lys	Tyr	Val	Leu	Arg	Asp	Leu	Ser	Lys
				245					250					255	
Pro	Thr	Gly	Thr	Gln	Ile	Ile	Thr	Tyr	Asp	Leu	Gln	Asn	Arg	Glu	Tyr
		260					265							270	
Asn	Leu	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Asn	Gln	Phe	Thr	Thr
	275						280					285			
Ser	Ser	Gln	Arg	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	His	Tyr	Asn	Leu	Gly	Lys	Val
	290					295					300				
Tyr	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Lys	Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Tyr	Asp	Asn	Lys
305					310					315					320
Gly	Gly	Lys	Ile	Val	Ser	Ser	Val	His	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Asn	Asn
				325					330					335	
Ala	Ala	Trp	Ile	Gly	Asp	Gln	Met	Ile	Tyr	Gly	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser
		340					345						350		
Phe	Phe	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Met	Asp	Val	Thr	Ala	His	Glu	Met
	355						360					365			
Thr	His	Gly	Val	Thr	Gln	Glu	Thr	Ala	Asn	Leu	Asn	Tyr	Glu	Asn	Gln
	370					375					380				
Pro	Gly	Ala	Leu	Asn	Glu	Ser	Phe	Ser	Asp	Val	Phe	Gly	Tyr	Phe	Asn
385				390						395					400
Asp	Thr	Glu	Asp	Trp	Asp	Ile	Gly	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Ser	Gln	Pro
				405					410					415	
Ala	Leu	Arg	Ser	Leu	Ser	Asn	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn
		420						425					430		
Phe	Lys	Asn	Tyr	Lys	Asn	Leu	Pro	Asn	Thr	Asp	Ala	Gly	Asp	Tyr	Gly
	435						440				445				
Gly	Val	His	Thr	Asn	Ser	Gly	Ile	Pro	Asn	Lys	Ala	Ala	Tyr	Asn	Thr
	450					455					460				
Ile	Thr	Lys	Ile	Gly	Val	Asn	Lys	Ala	Glu	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Ala
465					470					475					480
Leu	Thr	Val	Tyr	Leu	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Lys	Asp	Ala	Lys	Ala
				485					490					495	
Ala	Leu	Ile	Gln	Ser	Ala	Arg	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gln	Asp	Ala	Ala
		500						505					510		
Ser	Val	Glu	Ala	Ala	Trp	Asn	Ala	Val	Gly	Leu					
		515					520								

<210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 5
 10 gagctgggta aagcctatga at 22
 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 6
 gttcagcaac atgtctgcgc aggct 25
 <210> 7
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 7
 gctgagaatc ctcagcttaa agaaaacctg 30
 <210> 8
 35 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 8
 ggcttcacca tgatcatata tgtaagctt gggggg 36
 45 <210> 9
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 9
 cagggtttct ttaagctgag gattctcagc agcctgcgca gacatgttgc tgaac 55

5	<210> 10		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 10		
	gttcagcaac atgtctgcgc aggctgctga gaatcctcag cttaaagaaa acctg	55	
15	<210> 11		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 11		
	cccccaagc ttgacatata tgatcatggt gaagcc	36	
25	<210> 12		
	<211> 1566		
	<212> ADN		
	<213> Bacillus amyloliquefaciens		
30	<400> 12		
	gtgggttttag gtaagaaatt gtctgttgcgt gtcgccgctt cctttatgag ttttaaccatc 60		
	agtcctgccgg gtgttcaggc cgctgagaat cctcagctta aagaaaacct gacgaatttt 120		
	gtaccgaagc attcttttgt gcaatcagaa ttgcccttctg tcagtgacaa agctatcaag 180		
35	caataacttga aacaaaacgg caaagtcttt aaaggcaatc cttctgaaag attgaagctg 240		
	attgacaaaa cgaccgatga tctcggtctac aagcacttcc gttatgtgcc tgtcgtaaac 300		
	gggtgtgcctg tgaaagactc tcaagtcatt attcagctcg ataaatccaa caacgtctat 360		
	gcgatttaacg gtgaattaaa caacgatggt tccgccaaaa cggcaaacag caaaaaatta 420		
40	tctgcacaaac aggcgctgga tcatgcttat aaagcgatcg gcaaatcacc tgaagccgtt 480		
	tctaacggaa ccggttgcaaa caaaaacaaa gccgagctga aagcagcagc cacaaaagac 540		
	ggcaaatacc gcctcgcccta tgatgtaacc atccgctaca tcgaaccgga acctgcaaac 600		
	tggaagtaa ccggtgatgc ggaaacagga aaaatcctga aaaagcaaaa caaagtggag 660		
45	catgccgcca caaccggaac aggtacgact cttaaaggaa aaacgggtctc attaaatatt 720		
	tcttctgaaa gcggcaaaata tgtgtctgcgc gatctttcta aacctaccgg aacacaaatt 780		
	attacgtacg atctgcacaaa ccgcgagtat aacctgccgg gcacactcgt atccagcacc 840		
	acaaccagct ttacaacttc ttctcagcgc gctgccgttg atgcgcatta caacctcggc 900		
50	aaagtgtatg attatttcta tcagaagttt aatcgcaaca gctacgacaa taaaggcggc 960		
	aagatcgtat cctccgttca ttacggcagc agatacaata acgcagcctg gatcggcgac 1020		
	caaatgattt acggtgacgg cgacggttca ttcttctcac ctctttccgg ttcaatggac 1080		
	gtaaccgctc atgaaatgac acatggcggt acacaggaaa cagccaacct gaactacgaa 1140		
55	aatcagccgg gcgctttaaa cgaatccctc tctgatgtat tcgggtactt caacgatact 1200		
	gaggactggg atatcggtga agatattacg gtcagccagc cggctctccg cagcttatcc 1260		
	aatccgacaa aatacggaca gcctgataat ttcaaaaatt acaaaaacct tccgaacct 1320		
	gatcccgcg actacggcgg cgtgcataca aacagcggaa tcccgaacaa agccgcttac 1380		
60	aatacgatta caaaaatcgg cgtgaacaaa ggggagcaga ttactatcgt tgccttgacg 1440		
	gtatacctca ctccgtcatc aactttttaa gatgcaaaa cgcctttgat tcaatctcgc 1500		
	cgggaccttt acggctctca agatgctgca agcgtagaag ctgcctggaa tgcagtcgga 1560		
	ttgtaa	1566	
35	<210> 13		
	<211> 521		
	<212> PRT		
	<213> Bacillus amyloliquefaciens		

<400> 13

Met	Gly	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Ser	Phe	Met
1				5					10					15	
Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Leu	Pro	Gly	Val	Gln	Ala	Ala	Glu	Asn	Pro	Gln
			20					25					30		
Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Thr	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	His	Ser	Leu	Val	Gln
		35					40					45			
Ser	Glu	Leu	Pro	Ser	Val	Ser	Asp	Lys	Ala	Ile	Lys	Gln	Tyr	Leu	Lys
	50					55					60				
Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Phe	Lys	Gly	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu
65					70					75					80
Ile	Asp	Gln	Thr	Thr	Asp	Asp	Leu	Gly	Tyr	Lys	His	Phe	Arg	Tyr	Val
				85					90					95	
Pro	Val	Val	Asn	Gly	Val	Pro	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Val	Ile	Ile	His
			100					105					110		
Val	Asp	Lys	Ser	Asn	Asn	Val	Tyr	Ala	Ile	Asn	Gly	Glu	Leu	Asn	Asn
		115					120					125			
Asp	Val	Ser	Ala	Lys	Thr	Ala	Asn	Ser	Lys	Lys	Leu	Ser	Ala	Asn	Gln
	130					135					140				
Ala	Leu	Asp	His	Ala	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gly	Lys	Ser	Pro	Glu	Ala	Val
145					150					155					160
Ser	Asn	Gly	Thr	Val	Ala	Asn	Lys	Asn	Lys	Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Ala
			165						170					175	
Ala	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Arg	Leu	Ala	Tyr	Asp	Val	Thr	Ile	Arg
		180					185						190		
Tyr	Ile	Glu	Pro	Glu	Pro	Ala	Asn	Trp	Glu	Val	Thr	Val	Asp	Ala	Glu
		195					200					205			
Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Lys	Val	Glu	His	Ala	Ala	Thr
	210					215					220				
Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Leu	Lys	Gly	Lys	Thr	Val	Ser	Leu	Asn	Ile
225					230					235					240
Ser	Ser	Glu	Ser	Gly	Lys	Tyr	Val	Leu	Arg	Asp	Leu	Ser	Lys	Pro	Thr
			245						250					255	
Gly	Thr	Gln	Ile	Ile	Thr	Tyr	Asp	Leu	Gln	Asn	Arg	Glu	Tyr	Asn	Leu
		260					265						270		
Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Asn	Gln	Phe	Thr	Thr	Ser	Ser
		275					280					285			
Gln	Arg	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	His	Tyr	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Tyr	Asp
	290					295					300				
Tyr	Phe	Tyr	Gln	Lys	Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Tyr	Asp	Asn	Lys	Gly	Gly
305					310					315					320
Lys	Ile	Val	Ser	Ser	Val	His	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Asn	Asn	Ala	Ala
			325						330					335	
Trp	Ile	Gly	Asp	Gln	Met	Ile	Tyr	Gly	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		340						345					350		
Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Met	Asp	Val	Thr	Ala	His	Glu	Met	Thr	His
		355					360					365			
Gly	Val	Thr	Gln	Glu	Thr	Ala	Asn	Leu	Asn	Tyr	Glu	Asn	Gln	Pro	Gly
	370					375					380				
Ala	Leu	Asn	Glu	Ser	Phe	Ser	Asp	Val	Phe	Gly	Tyr	Phe	Asn	Asp	Thr
385					390					395					400
Glu	Asp	Trp	Asp	Ile	Gly	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Ser	Gln	Pro	Ala	Leu
			405						410					415	
Arg	Ser	Leu	Ser	Asn	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Phe	Lys
		420						425					430		
Asn	Tyr	Lys	Asn	Leu	Pro	Asn	Thr	Asp	Ala	Gly	Asp	Tyr	Gly	Gly	Val
		435					440					445			
His	Thr	Asn	Ser	Gly	Ile	Pro	Asn	Lys	Ala	Ala	Tyr	Asn	Thr	Ile	Thr
	450					455					460				
Lys	Ile	Gly	Val	Asn	Lys	Ala	Glu	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Leu	Thr
465					470					475					480
Val	Tyr	Leu	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Lys	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu
			485						490					495	
Ile	Gln	Ser	Ala	Arg	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gln	Asp	Ala	Ala	Ser	Val
		500						505					510		
Glu	Ala	Ala	Trp	Asn	Ala	Val	Gly	Leu							
		515					520								

5

<210> 14

<400> 14

ES 2 529 815 T3

000

<210> 15

5 <400> 15

000

<210> 16

10 <400> 16

000

<210> 17

<211> 194

15 <212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 17

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

20

<210> 18

<211> 300

25 <212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 18

Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ile Ser Ser Glu Ser Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser
20 25 30
Lys Pro Thr Gly Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Glu
35 40 45
Tyr Asn Leu Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Gln Phe Thr
50 55 60
Thr Ser Ser Gln Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys
65 70 75 80
Val Tyr Asp Tyr Phe Tyr Gln Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn
85 90 95
Lys Gly Gly Lys Ile Val Ser Ser Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn
100 105 110
Asn Ala Ala Trp Ile Gly Asp Gln Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Gly
115 120 125
Ser Phe Phe Ser Pro Leu Ser Gly Ser Met Asp Val Thr Ala His Glu
130 135 140
Met Thr His Gly Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Asn Tyr Glu Asn
145 150 155 160
Gln Pro Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr Phe
165 170 175
Asn Asp Thr Glu Asp Trp Asp Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Gln
180 185 190
Pro Ala Leu Arg Ser Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Gln Pro Asp
195 200 205
Asn Phe Lys Asn Tyr Lys Asn Leu Pro Asn Thr Asp Ala Gly Asp Tyr
210 215 220
Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn Lys Ala Ala Tyr Asn
225 230 235 240
Thr Ile Thr Lys Ile Gly Val Asn Lys Ala Glu Gln Ile Tyr Tyr Arg
245 250 255
Ala Leu Thr Val Tyr Leu Thr Pro Ser Ser Thr Phe Lys Asp Ala Lys
260 265 270
Ala Ala Leu Ile Gln Ser Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Gln Asp Ala
275 280 285
Ala Ser Val Glu Ala Ala Trp Asn Ala Val Gly Leu
290 295 300

<210> 19

<211> 46

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 19

ctgcaggaat tcagatctta acattttcc cctatcatt ttcccg 46

<210> 20

15 <211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador

<400> 20

ggatccaagc ttccgggaa aagacatata tgatcatggt gaagcc 46

25 <210> 21

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

5 <400> 21
 gtcagtcaga tcttcctca ggttatgacc 30

10 <210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

20 <400> 22
 gtctcgaaga tctgattgct taactgcttc 30

25 <210> 23
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

35 <400> 23
 gtggagcatg ccgccacann sggaacaggt acgactctta a 41

40 <210> 24
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <400> 24
 caggtacgac tcttaaanns aaaacggtct cattaaatat 40

50 <210> 25
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 25
 gtacgactct taaagganns acggtctcat taaatatttc 40

15 <210> 26
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <400> 26
 cgactcttaa aggaaaanns gtctcattaa atatttc 37

30 <210> 27
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 27
 cattaaatat ttctctgaa nnsaggcaaat atgtgctgcg 40

50 <210> 28
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 28
 taaatatttc ttctgaaagc nnsaaatatg tgctgcgga tc 42

5

<210> 29
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

15

<400> 29
 gtgctgcgcg atctttctnn scctaccgga acacaaatta t 41

20

<210> 30
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t

30

<400> 30
 aaattattac gtacgatctg nnsaaccgag agtataacct g 41

35

<210> 31
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> cebador

45

<220>
 <221> misc feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t

50

<400> 31
 ttattacgta cgatctgcaa nnsccgagat ataacctgcc 40

<210> 32

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 32
 15 cgtacgatct gcaaaacnns gagtataacc tgccggg 37

<210> 33
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 33
 30 gatctgcaaa accgcgagnn saacctgccg ggcacactc 39

<210> 34
 <211> 41
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 34
 45 ctgcaaaacc gcgagtatnn sctgccgggc acactcgat c 41

<210> 35
 <211> 38
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <400> 35
 gagtataacc tgccgggcnn sctcgtatcc agcaccac 38
 <210> 36
 10 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 20 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 36
 cgggcacact cgtatccnns accacaaacc agtttac 37
 25 <210> 37
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 37
 40 gcacactcgt atccagcnns acaaaccagt ttacaac 37
 <210> 38
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 38

	cactcgtatc cagcaccnns aaccagtta caacttc	37
	<210> 39	
	<211> 37	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> cebador	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(19)	
15	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 39	
	ccacaaacca gtttacanns tcttctcagc gcgctgc	37
	<210> 40	
20	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(19)	
30	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 40	
	caaaccagtt tacaactnns tctcagcgcg ctgccgttg	39
35	<210> 41	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
	<221> misc_feature	
45	<222> (19)..(20)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 41	
50	gtgtatgatt atttctatnn saagttaat cgcaacag	38
	<210> 42	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 42
 attatttcta tcagaagttt nns c gcaaca gctacgacaa taa 43

15 <210> 43
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t

30 <400> 43
 ttaatcgcaa cagctacgac nnsaaaggcg gcaagatcgt atc 43

35 <210> 44
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <400> 44
 gcaacagcta cgacaatnns ggcggcaaga tcgtatc 37

55 <210> 45
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 45
ctacgacaat aaaggcggcn nsatcgtatc ctccgttcat ta 42

5

<210> 46
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

15

<400> 46
gaggactggg atatcggttnn sgatattacg gtcagccag 39

20

<210> 47
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc feature
<222> (19)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

30

<400> 47
gtcagccagc cggctctcnn sagcttatcc aatccgac 38

35

<210> 48
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> cebador

45

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> n es a, c, g, o t

50

<400> 48
gacagcctga taatttcnns aattacaaaa accttcc 37

<210> 49

<211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 49
 gataatttca aaaattacnn saaccttccg aacctgatg 40
 15

<210> 50
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> cebador

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 50
 30 gcgactacgg cggcgtgnns acaaacagcg gaatccc 37

<210> 51
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 51
 ctttgattca atctgcgnns gacctttacg gctctcaag 39

50 <210> 52
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <400> 52
 ttaagagtcg tacctgttcc snntgtggcg gcatgctcca c 41
 <210> 53
 10 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 20 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 53
 atatttaatg agaccgtttt snntttaaga gtcgtacctg 40
 25 <210> 54
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 54
 gaaatattta atgagaccgt snntccttta agagtcgtac 40
 40 <210> 55
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 55

gaaatatta atgagacsnn tttccttta agagtcg 37

<210> 56
<211> 40
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

15 <400> 56
cgcagcacat attgccsnn ttcagaagaa atatttaatg 40

<210> 57
20 <211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (21)..(22)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 57
gatcgcgcag cacatatts nngctttcag aagaaatatt ta 42

35 <210> 58
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (22)..(23)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 58
ataatttggtg ttccggtagg snnagaaaga tcgcgagca c 41

50 <210> 59
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 59
 caggttatac tcgcggttsn ncagatcgta cgtaataatt t 41

15 <210> 60
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <400> 60
 ggcaggttat actcgcgssnn ttgcagatcg tacgtaataa 40

30 <210> 61
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 61
 cccggcaggt tatactcsnn gtttgcaga tcgtacg 37

50 <210> 62
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc feature
 <222> (20)..(21)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 62
gagtggtccc ggcaggtsn nctcgcggtt tgcagatc 39

5

<210> 63
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> n es a, c, g, o t

15

<400> 63
gatacgagtg tgcccggcag snnatactcg cggtttgca g 41

20

<210> 64
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

30

<400> 64
gtggtgctgg atacgagsnn gcccggcagg ttatactc 38

35

<210> 65
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> cebador

45

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

50

<400> 65
gtaaactggt ttgtgtsnn ggatacgagt gtgcccg 37

<210> 66

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 66
 gttgtaaact ggttgtsnn gctggatacg agtgtgc 37
 15

<210> 67
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> cebador

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 67
 30 gaagttgtaa actggttsnn ggtgctggat acgagtg 37

<210> 68
 <211> 37
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 68
 gcagcgcgct gagaagasnn tgtaaactgg ttgtgg 37

<210> 69
 <211> 39
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <400> 69
 caacggcagc gcgctgagas nnagttgtaa actggttg 39
 <210> 70
 10 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 20 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 70
 ctgttgcgat taaacttsnn atagaaataa tcatacac 38
 25 <210> 71
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 71
 ttattgtcgt agctgtgcg snnaaacttc tgatagaaat aat 43
 40 <210> 72
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 72

gatacgaatct tgccgccttt snngtcgtag ctgtgcgat taa 43

<210> 73
<211> 37
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

15 <400> 73
gatacgaatct tgccgccsnn attgtcgtag ctgtgc 37

<210> 74
20 <211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
30 <223> n es a, c, g, o t

<400> 74
taatgaacgg aggatacgaat snngccgcct ttattgtcgt ag 42

35 <210> 75
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (20)..(21)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 75
ctggctgacc gtaatatcsn naccgatatc ccagtcctc 39

50 <210> 76
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 76
 gtcggattgg ataagctsnn gagagccggc tggctgac 38

15 <210> 77
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <400> 77
 ggaaggtttt tgtaatsnn gaaattatca ggctgtc 37

30 <210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 78
 catcagtgtt cggaaggts nngtaattt tgaaattatc 40

45 <210> 79
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 79
gggattccgc tgttgtsnn cacgccgccg tagtcgc 37

5

<210> 80
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> n es a, c, g, o t

15

<400> 80
cttgagagcc gtaaaggctcs nncgcagatt gaatcaaag 39

20

<210> 81
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

30

<400> 81
gtggagcatg ccgccacann sggaacaggt acgactctta aagg 44

35

<210> 82
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> cebador

45

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(25)
<223> n es a, c, g, o t

50

<400> 82
ccggaacagg tacgactctt aaannsaaaa cggctctcatt aaatatttct tctgaaagc 59

<210> 83

<211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (29)..(30)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 83
 15 cggaaacacaa attattacgt acgatctggn saaccgag tataacctgc c 51

<210> 84
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 84
 30 gtacgatctg caaaaccgag agnnsaacct gccgggcaca ctgatatcc 49

<210> 85
 <211> 51
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 85
 45 gtacgatctg caaaaccgag agtatnnsct gccgggcaca ctgatatcca g 51

<210> 86
 <211> 48
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <400> 86
 ccagcaccac aaaccagttt acannstctt ctcagcgcg c tgccgttg 48
 <210> 87
 10 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(31)
 20 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 87
 gcagatacaa taacgcagcc tggatcggn nscaaatgat ttacggtgac ggcgac 56
 25 <210> 88
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (26)..(27)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 88
 ccaaagtatt tacggtgacg gcgacnnsic attcttctca cctcttccg gttc 54
 40 <210> 89
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 89

ggtagcggcg acggttcann sttctcacct cttccggtc c 41

5 <210> 90
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 90
catgaaatga cacatggcgt tacannsgaa acagccaacc tgaactac 48

20 <210> 91
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(29)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 91
catgaaatga cacatggcgt tacacagnns acagccaacc tgaactacg 49

35 <210> 92
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> n es a, c, g, o t

50 <400> 92
catggcggtta cacaggaaac agccnnsctg aactacgaaa atcagccg 48

<210> 93
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc feature
 <222> (27)..(28)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 93
 ctgatgtatt cgggtacttc aacgatnnsaggactggga tatcggtg 48

15 <210> 94
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t

30 <400> 94
 gcagcttatt caatccgaca aaannsggac agcctgataa ttcaaaaat tac 53

35 <210> 95
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(28)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <400> 95
 gcagcttatt caatccgaca aaatacnsc agcctgataa ttcaaaaat taaaaaacc 60

55 <210> 96
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

ES 2 529 815 T3

<223> n es a, c, g, o t

<400> 96
gaacactgat gccggcgacn nsggcggcgt gcatacaaac 40

5

<210> 97
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n es a, c, g, o t

15

<400> 97
gaacaaagcc gcttacaata cgattnnsaa aatcggcgtg aacaaagcg 49

20

<210> 98
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n es a, c, g, o t

30

<400> 98
gcagatttac tatcgtgctc tgacgnnsa cctcactccg tcatcaactt ttaaag 56

35

<210> 99
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> cebador

45

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n es a, c, g, o t

50

<400> 99
gatttactat cgtgctctga cggatnnsct cactccgtca tcaactttta aag 53

<210> 100

<211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 100
 gtgctctgac ggtatacctc nnsccgtcat caacttttaa agatgc 46
 15

<210> 101
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> cebador

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (28)..(29)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 101
 30 ccgtcatcaa cttttaaaga tgcaaaanns gcttgattc aatctgcgcg g 51

<210> 102
 <211> 42
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 102
 gattcaatct gcgcgggacn nstacggctc tcaagatgct gc 42

<210> 103
 <211> 39
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <400> 103
 cgcgggacct ttacggcnns caagatgctg caagcgtag 39
 <210> 104
 10 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 20 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 104
 cctttacggc tctcaagatg ctnnsagcgt agaagctgcc tggaatg 47
 25 <210> 105
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 105
 ctcaagatgc tgcaagcgta gaannsgcct ggaatgcagt cggattg 47
 40
 <210> 106
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cebador
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 106

gcaagcgtag aagctgcctg gnnsgcagtc ggattgtaaa caagaaaag 49

<210> 107
<211> 53
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
15 <223> n es a, c, g, o t

<400> 107
gaagctgcct ggaatgcagt cnnsttgtaa acaagaaaag agaccggaaa tcc 53

<210> 108
20 <211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
30 <223> n es a, c, g, o t

<400> 108
cacactcgta tccagcacn nsaaccagtt tacaacttct tctcag 46

<210> 109
35 <211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (20)..(21)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 109
ctccgttcat tacggcagcn nstacaataa cgcagcctgg atc 43

50 <210> 110
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 110
 ctcacctctt tccggtcaa tgnnsgtaac cgctcatgaa atgacac 47

15 <210> 111
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> n es a, c, g, o t

30 <400> 111
 cctttaagag tcgtacctgt tccsnntgtg gcggcatgct ccac 44

35 <210> 112
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <400> 112
 gcttcagaa gaaatattta atgagaccgt tttsnnttta agagtcgtac ctgtccgg 59

55 <210> 113
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)

ES 2 529 815 T3

<223> n es a, c, g, o t

<400> 113
 5 ggcaggttat actgcggtt snncagatcg tacgtaataa ttgtgtcc g 51

<210> 114
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (26).. (27)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 114
 20 ggatacgagt gtgcccggca ggtsnnctc gcggtttgc agatcgta c 49

<210> 115
 <211> 51
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25).. (26)
 <223> n es a, c, g, o t

35 <400> 115
 ctggatacga gtgtgcccg cagsnnatac tcgcggttt gcagatcgta c 51

<210> 116
 <211> 48
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <400> 116
 caacggcagc gcgctgagaa gasnntgtaa actggttgt ggtgctgg 48

<210> 117

<211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (26)..(27)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 117
 gtcgccgtca ccgtaaatca ttgsnngcc gatccaggct gcgttattgt atctgc 56
 15

<210> 118
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> cebador

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (28)..(29)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 118
 30 gaaccggaaa gaggtgagaa gaatgasnng tcgccgtcac cgtaaatcat ttgg 54

<210> 119
 <211> 41
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 119
 ggaccggaaa gaggtgagaa snntgaaccg tcgccgtcac c 41

<210> 120
 <211> 48
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <400> 120
 gtagttcagg ttggctgttt csnnrtgtaac gccatgtgtc atttcattg 48
 10
 <210> 121
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 121
 cgtagttcag gttggctgts nnctgtgtaa cgccatgtgt catttcattg 49
 25
 <210> 122
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 122
 cggctgatt tcgtagttca gsnnngctgt ttctgtgta acgccattg 48
 40
 <210> 123
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cebador
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 123

ES 2 529 815 T3

caccgatatc ccagtcctcs nnatcgttga agtaccgaa tacatcag 48

<210> 124
<211> 53
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
15 <223> n es a, c, g, o t

<400> 124
gtaattttg aaattatcag gctgtccsnn tttgtcgga ttggataagc tgc 53

<210> 125
20 <211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(34)
30 <223> n es a, c, g, o t

<400> 125
ggtttttga attttgaaa ttatcaggct gsnngtattt tgcggattg gataagctgc 60

<210> 126
35 <211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (20)..(21)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 126
gtttgtatgc acgccgccsn ngtcgccgc atcagtgtc 40

50 <210> 127
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 127
 cgctttgttc acgccgattt tsnnaatcgt attgtaagcg gctttgttc 49

15 <210> 128
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(31)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <400> 128
 ctttaaaagt tgatgacgga gtgaggtasn ncgtcagagc acgatagtaa atctgc 56

30 <210> 129
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(28)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 129
 ctttaaaagt tgatgacgga gtgagsnnta ccgtcagagc acgatagtaa atc 53

50 <210> 130
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)

	<223> n es a, c, g, o t	
	<4'00> 130	
5	gcacatcttaa aagttgatga cggsnngagg tataccgtca gagcac	46
	<210> 131	
	<211> 51	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 131	
20	ccgcgcagat tgaatcaaag csnnntttgc atcttataaa gttgatgacg g	51
	<210> 132	
	<211> 42	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (22)..(23)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 132	
35	gcagcatctt gagagccgta snngtccgc gcagattgaa tc	42
	<210> 133	
	<211> 39	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n es a, c, g, o t	
50	<400> 133	
	ctacgcttgc agcatcttgs nngccgtaaa ggtcccgcg	39
	<210> 134	

<211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 134
 cattccaggc agcttctacg ctsnnagcat cttgagagcc gtaaagg 47
 15

<210> 135
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> cebador

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 135
 30 caatccgact gcattccagg csnnittctac gcttgacga tcttgag 47

<210> 136
 <211> 49
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(28)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 136
 cttttctgt ttacaatccg actgcsnncc aggcagcttc tacgcttg 49

50 <210> 137
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(32)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <400> 137
 ggatttcggt tctctttct tgtttacaas nngactgcat tccaggcagc ttc 53
 10
 <210> 138
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 138
 ctgagaagaa gttgtaaact ggtsnnggt gctggatacg agtgtg 46
 25
 <210> 139
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 139
 gatccaggct gcgttattgt asnngctgcc gtaatgaacg gag 43
 40
 <210> 140
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cebador
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 140

	gtgtcatttc atgagcgggt acsnncattg aaccggaaag aggtgag	47
5	<210> 141 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
15	<220> <221> misc_feature <222> (27).. (28) <223> n es a, c, g, o t	
	<400> 141 ggcacgggtc attctctca cctctnnsg gttcaatgga cgtaaccgct c	51
20	<210> 142 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
30	<220> <221> misc_feature <222> (30)..(31) <223> n es a, c, g, o t	
35	<400> 142 ggcacgggtc attctctca cctcttcn nstcaatgga cgtaaccgct catg	54
40	<210> 143 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<220> <221> misc_feature <222> (20)..(21) <223> n es a, c, g, o t	
50	<400> 143 cttctcacct cttccggt n satggacgt aaccgctcat g	41
	<210> 144 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 144
 cctctttccg gttcaatgga cnnsaccgct catgaaatga cac 43

15 <210> 145
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <400> 145
 cagccagccg gctctccgcn nsttatccaa tccgacaaaa tacggacag 49

30 <210> 146
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 146
 cagccagccg gctctccgca gcnnstccaa tccgacaaaa tacggacag 49

45 <210> 147
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)

	<223> n es a, c, g, o t	
5	<400> 147 cagccagccg gctctccgca gcttannsaa tccgacaaaa tacggacagc c	51
10	<210> 148 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<220> <221> misc_feature <222> (31)..(32) <223> n es a, c, g, o t	
25	<400> 148 cagcctgata attcaaaaa ttacaaaaac nnsccgaaca ctgatgccgg cgac	54
30	<210> 149 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<220> <221> misc_feature <222> (34)..(35) <223> n es a, c, g, o t	
45	<400> 149 cagcctgata attcaaaaa ttacaaaaac cttnsaaca ctgatgccgg cgac	54
50	<210> 150 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<220> <221> misc_feature <222> (37)..(38) <223> n es a, c, g, o t	
	<400> 150 cagcctgata attcaaaaa ttacaaaaac cttccgnnsa ctgatgccgg cgactac	57
	<210> 151	

	<211> 59	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (40)..(41)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 151	
15	cagcctgata atttcaaaaa ttacaaaaac ctccgaacn nsgatgccgg cgactacgg	59
	<210> 152	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (43)..(44)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 152	
30	cagcctgata atttcaaaaa ttacaaaaac ctccgaaca ctnnsgccgg cgactacggc	60
	ggcgg	64
	<210> 153	
	<211> 66	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (46)..(47)	
	<223> n es a, c, g, o t	
45	<400> 153	
	cagcctgata atttcaaaaa ttacaaaaac ctccgaaca ctgatnnsyg cgactacggc	60
	ggcgtg	66
	<210> 154	
50	<211> 42	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> cebador

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 154
 ccttccgaac actgatgccn nsgactacgg cggcgtgcat ac 42

 15 <210> 155
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 155
 cgggaccttt acggctctnn sgatgctgca agcgtagaag ctg 43
 30
 <210> 156
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> cebador

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 156
 45 gcgtagaagc tgcttgaat nnsbtcggat tgtaacaag aaaagagacc gg 52

 50 <210> 157
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (24)..(25)	
5	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 157	
	gagcgggttac gtccattgaa ccsnnaagag gtgagaagaa tgaaccgtcg c	51
10	<210> 158	
	<211> 54	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
	<221> misc_feature	
20	<222> (24)..(25)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 158	
	catgagcgggt tacgtccatt gasnnggaaa gaggtgagaa gaatgaaccg tcgc	54
25	<210> 159	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 159	
40	catgagcgggt tacgtccats nnaccggaaa gaggtgagaa g	41
	<210> 160	
	<211> 43	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
50	<221> misc_feature	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 160	

gtgtcatttc atgagcggts nngtccattg aaccggaaag agg 43

<210> 161
<211> 49
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador
10

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n es a, c, g, o t
15

<400> 161
ctgtccgtat ttgtcggat tggataasnn gcggagagcc ggctggctg 49

<210> 162
20 <211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
30 <223> n es a, c, g, o t

<400> 162
ctgtccgtat ttgtcggat tggasnnngct gcggagagcc ggctggctg 49

35 <210> 163
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (25)..(26)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 163
50 ggctgtccgt atttgcgg attsnntaag ctgcggagag ccggctggct g 51

<210> 164
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 164
 gtcgccggca tcagtggtcg gsnngtttt gtaattttg aaattatcag gctg 54

15 <210> 165
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

30 <400> 165
 gtcgccggca tcagtgtsn naaggtttt gtaattttg aaattatcag gctg 54

35 <210> 166
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <400> 166
 gtagtcgccg gcatcagtsn ncggaagggt tttgtaatt ttgaaattat caggctg 57

55 <210> 167
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)

ES 2 529 815 T3

<223> n es a, c, g, o t

<400> 167
ccgtagtcgc cggcatcsnn gttcggaagg ttttgtaat tttgaaatt atcaggctg 59

5

<210> 168
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> n es a, c, g, o t

15

<400> 168

20

cgccgcgcgta gtcgcgggcs nnagtgttcg gaagggtttt gtaatttttg aaattatcag 60
gctg 64

<210> 169
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> cebador

30

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n es a, c, g, o t

35

<400> 169

cacgccgcgcg tagtcgccsn natcagtgtt cggaagggtt ttgtaatttt tgaaattatc 60
aggctg 66

40

<210> 170
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> n es a, c, g, o t

50

ES 2 529 815 T3

```

<400> 170
gtatgcacgc cgccgtagtc snnggcatca gtgttcggaa gg      42

5
<210> 171
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(25)
15
<223> n es a, c, g, o t

<400> 171
cagcttctac gcttgacagca tcsnnagagc cgtaaaggtc ccg      43

20
<210> 172
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc_feature
30
<222> (31)..(32)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 172
ccggtctctt ttctgttta caatccgacs nnattccagg cagcttctac gc      52

35
<210> 173
<211> 521
<212> PRT
<213> Bacillus amyloliquefaciens

40
<400> 173

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

```

```

Ser Leu Thr Ile Ser Leu Pro Gly Val Gln Ala Ala Glu Asn Pro Gln
      20      25      30
Leu Lys Glu Asn Leu Thr Asn Phe Val Pro Lys His Ser Leu Val Gln
      35      40      45
Ser Glu Leu Pro Ser Val Ser Asp Lys Ala Ile Lys Gln Tyr Leu Lys
      50      55      60
Gln Asn Gly Lys Val Phe Lys Gly Asn Pro Ser Glu Arg Leu Lys Leu
      65      70      75      80
Ile Asp Gln Thr Thr Asp Asp Leu Gly Tyr Lys His Phe Arg Tyr Val
      85      90      95
Pro Val Val Asn Gly Val Pro Val Lys Asp Ser Gln Val Ile Ile His
      100      105      110
Val Asp Lys Ser Asn Asn Val Tyr Ala Ile Asn Gly Glu Leu Asn Asn
      115      120      125
Asp Val Ser Ala Lys Thr Ala Asn Ser Lys Lys Leu Ser Ala Asn Gln
      130      135      140
Ala Leu Asp His Ala Tyr Lys Ala Ile Gly Lys Ser Pro Glu Ala Val
      145      150      155      160
Ser Asn Gly Thr Val Ala Asn Lys Asn Lys Ala Glu Leu Lys Ala Ala
      165      170      175
Ala Thr Lys Asp Gly Lys Tyr Arg Leu Ala Tyr Asp Val Thr Ile Arg
      180      185      190
Tyr Ile Glu Pro Glu Pro Ala Asn Trp Glu Val Thr Val Asp Ala Glu
      195      200      205
Thr Gly Lys Ile Leu Lys Lys Gln Asn Lys Val Glu His Ala Ala Thr
      210      215      220
Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser Leu Asn Ile
      225      230      235      240
Ser Ser Glu Ser Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser Lys Pro Thr
      245      250      255
Gly Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Glu Tyr Asn Leu
      260      265      270
Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Gln Phe Thr Thr Ser Ser
      275      280      285
Gln Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys Val Tyr Asp
      290      295      300
Tyr Phe Tyr Gln Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn Lys Gly Gly
      305      310      315      320
Lys Ile Val Ser Ser Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn Asn Ala Ala
      325      330      335
Trp Ile Gly Asp Gln Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Ser Phe Phe
      340      345      350
Ser Pro Leu Ser Gly Ser Met Asp Val Thr Ala His Glu Met Thr His
      355      360      365
Gly Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Asn Tyr Glu Asn Gln Pro Gly
      370      375      380
Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr Phe Asn Asp Thr
      385      390      395      400
Glu Asp Trp Asp Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Gln Pro Ala Leu
      405      410      415
Arg Ser Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Gln Pro Asp Asn Phe Lys
      420      425      430
Asn Tyr Lys Asn Leu Pro Asn Thr Asp Ala Gly Asp Tyr Gly Gly Val
      435      440      445
His Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn Lys Ala Ala Tyr Asn Thr Ile Thr
      450      455      460
Lys Ile Gly Val Asn Lys Ala Glu Gln Ile Tyr Tyr Arg Ala Leu Thr
      465      470      475      480
Val Tyr Leu Thr Pro Ser Ser Thr Phe Lys Asp Ala Lys Ala Ala Leu
      485      490      495
Ile Gln Ser Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Gln Asp Ala Ala Ser Val
      500      505      510
Glu Ala Ala Trp Asn Ala Val Gly Leu
      515      520

```

<210> 174

<211> 521

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 174

```

Met Gly Leu Gly Lys Lys Leu Ser Val Arg Val Ala Ala Ser Phe Met
1      5      10      15
Ser Leu Ser Ile Ser Leu Pro Gly Val Gln Ala Ala Glu Gly His Gln
20      25      30
Leu Lys Glu Asn Gln Thr Asn Phe Leu Ser Lys Lys Pro Ile Ala Gln
35      40      45
Ser Glu Leu Ser Ala Pro Asn Asp Lys Ala Val Lys Ser Val Lys Leu
50      55      60
Lys Asn Ser Asn Ile Phe Lys Gly Asp Pro Ser Lys Ser Val Lys Leu
65      70      75      80
Val Glu Ser Thr Thr Asp Ala Leu Gly Tyr Lys His Phe Arg Tyr Ala
85      90      95
Pro Val Val Asn Gly Val Pro Ile Lys Asp Ser Gln Val Ile Val His
100     105     110
Val Asp Lys Ser Asp Asn Val Tyr Ala Val Asn Gly Glu Leu His Asn
115     120     125
Gln Ser Ala Ala Lys Thr Asp Asn Ser Gln Lys Val Ser Ser Glu Lys
130     135     140
Ala Leu Ala Leu Ala Phe Lys Ala Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ala Val
145     150     155     160
Ser Asn Gly Ala Ala Lys Asn Ser Asn Lys Ala Glu Leu Lys Ala Ile
165     170     175
Glu Thr Lys Asp Gly Ser Tyr Arg Leu Ala Tyr Asp Val Thr Ile Arg
180     185     190
Tyr Val Glu Pro Glu Pro Ala Asn Trp Glu Val Leu Val Asp Ala Glu
195     200     205
Thr Gly Ser Ile Leu Lys Gln Gln Asn Lys Val Glu His Ala Ala Ala
210     215     220
Thr Gly Ser Gly Thr Thr Leu Lys Gly Ala Thr Val Pro Leu Asn Ile
225     230     235     240
Ser Tyr Glu Gly Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser Lys Pro Thr
245     250     255
Gly Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Gln Ser Arg Leu
260     265     270
Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Lys Thr Phe Thr Ser Ser Ser
275     280     285
Gln Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys Val Tyr Asp
290     295     300
Tyr Phe Tyr Ser Asn Phe Lys Arg Asn Ser Tyr Asp Asn Lys Gly Ser
305     310     315     320
Lys Ile Val Ser Ser Val His Tyr Gly Thr Gln Tyr Asn Asn Ala Ala
325     330     335
Trp Thr Gly Asp Gln Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Ser Phe Phe
340     345     350
Ser Pro Leu Ser Gly Ser Leu Asp Val Thr Ala His Glu Met Thr His
355     360     365
Gly Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Ile Tyr Glu Asn Gln Pro Gly
370     375     380
Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr Phe Asn Asp Thr
385     390     395     400
Glu Asp Trp Asp Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Gln Pro Ala Leu
405     410     415
Arg Ser Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Asn Gln Pro Asp Asn Tyr Ala
420     425     430
Asn Tyr Arg Asn Leu Pro Asn Thr Asp Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Val
435     440     445
His Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn Lys Ala Ala Tyr Asn Thr Ile Thr
450     455     460
Lys Leu Gly Val Ser Lys Ser Gln Gln Ile Tyr Tyr Arg Ala Leu Thr
465     470     475     480
Thr Tyr Leu Thr Pro Ser Ser Thr Phe Lys Asp Ala Lys Ala Ala Leu
485     490     495
Ile Gln Ser Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Thr Asp Ala Ala Lys Val
500     505     510
Glu Ala Ala Trp Asn Ala Val Gly Leu
515     520

```

<210> 175

<211> 509

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 175

```

Met Arg Lys Phe Ser Arg Tyr Ala Phe Thr Ser Met Ala Thr Val Thr
1      5      10      15
Leu Leu Ser Ser Leu Thr Pro Ala Ala Leu Ala Ser Asp Thr Asn His
20      25      30
Lys Pro Ala Thr Ser Asp Ile Asn Phe Glu Ile Thr Gln Lys Ser Asp
35      40      45
Ala Val Lys Ala Leu Lys Glu Leu Pro Lys Ser Glu Asn Val Lys Asn
50      55      60
His Tyr Gln Asp Tyr Ser Val Thr Asp Val Lys Thr Asp Lys Lys Gly
65      70      75      80
Phe Thr His Tyr Thr Leu Gln Pro Ser Val Asp Gly Val His Ala Pro
85      90      95
Asp Lys Glu Val Lys Val His Ala Asp Lys Ser Gly Lys Val Val Leu
100     105     110
Ile Asn Gly Asp Thr Asp Ala Lys Lys Val Lys Pro Thr Asn Lys Val
115     120     125
Thr Leu Ser Lys Asp Glu Ala Ala Asp Lys Ala Phe Asn Ala Val Lys
130     135     140
Ile Asp Lys Asn Lys Ala Lys Asn Leu Gln Asp Asp Val Ile Lys Glu
145     150     155     160
Asn Lys Val Glu Ile Asp Gly Asp Ser Asn Lys Tyr Ile Tyr Asn Ile
165     170     175
Glu Leu Ile Thr Val Thr Pro Glu Ile Ser His Trp Lys Val Lys Ile
180     185     190
Asp Ala Asp Thr Gly Ala Val Val Glu Lys Thr Asn Leu Val Lys Glu
195     200     205
Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Asp
210     215     220
Ile Asn Ile Asn Ser Ile Asp Gly Gly Phe Ser Leu Glu Asp Leu Thr
225     230     235     240
His Gln Gly Lys Leu Ser Ala Tyr Asn Phe Asn Asp Gln Thr Gly Gln
245     250     255
Ala Thr Leu Ile Thr Asn Glu Asp Glu Asn Phe Val Lys Asp Asp Gln
260     265     270
Arg Ala Gly Val Asp Ala Asn Tyr Tyr Ala Lys Gln Thr Tyr Asp Tyr
275     280     285
Tyr Lys Asn Thr Phe Gly Arg Glu Ser Tyr Asp Asn His Gly Ser Pro
290     295     300
Ile Val Ser Leu Thr His Val Asn His Tyr Gly Gly Gln Asp Asn Arg
305     310     315     320
Asn Asn Ala Ala Trp Ile Gly Asp Lys Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp
325     330     335
Gly Arg Thr Phe Thr Asn Leu Ser Gly Ala Asn Asp Val Val Ala His
340     345     350
Glu Leu Thr His Gly Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Glu Tyr Lys
355     360     365
Asp Gln Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr
370     375     380
Phe Val Asp Asp Glu Asp Phe Leu Met Gly Glu Asp Val Tyr Thr Pro
385     390     395     400
Gly Lys Glu Gly Asp Ala Leu Arg Ser Met Ser Asn Pro Glu Gln Phe
405     410     415
Gly Gln Pro Ser His Met Lys Asp Tyr Val Tyr Thr Glu Lys Asp Asn
420     425     430
Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn Lys Ala Ala Tyr Asn
435     440     445
Val Ile Gln Ala Ile Gly Lys Ser Lys Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Arg
450     455     460
Ala Leu Thr Glu Tyr Leu Thr Ser Asn Ser Asn Phe Lys Asp Cys Lys
465     470     475     480
Asp Ala Leu Tyr Gln Ala Ala Lys Asp Leu Tyr Asp Glu Gln Thr Ala
485     490     495
Glu Gln Val Tyr Glu Ala Trp Asn Glu Val Gly Val Glu
500     505

```

5

<210> 176

<211> 548

<212> PRT

<213> Bacillus stearothermophilis

<400> 176

Met	Asn	Lys	Arg	Ala	Met	Leu	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ala	Pro	Ile	Gly	Ala	Ser	Ala	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile	Val	Trp
			20					25					30		
Asn	Glu	Gln	Trp	Lys	Thr	Pro	Ser	Phe	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Asn
		35					40					45			
Gly	Gly	Glu	Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Val	Tyr	Gln	Tyr	Val	Asp	Arg
	50					55					60				
Glu	Asn	Gly	Thr	Phe	Arg	Leu	Gly	Gly	Arg	Ala	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala
65					70				75					80	
Leu	Ile	Gly	Lys	Gln	Thr	Asp	Glu	Leu	Gly	His	Thr	Val	Met	Arg	Phe
				85					90					95	
Glu	Gln	Arg	His	His	Gly	Ile	Pro	Val	Tyr	Gly	Thr	Met	Leu	Ala	Ala
			100					105					110		
His	Val	Lys	Asp	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Pro
		115					120					125			
Asn	Leu	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Leu	Lys	Lys	Ala	Lys	Thr	Val	Thr	Val
	130					135					140				
Gln	Gln	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Glu	Gln	Asp	Val	Thr	Glu	Thr	Val	Thr
145					150					155				160	
Lys	Glu	Arg	Pro	Thr	Thr	Glu	Asn	Gly	Glu	Arg	Thr	Arg	Leu	Val	Ile
				165					170					175	
Tyr	Pro	Thr	Asp	Gly	Thr	Ala	Arg	Leu	Ala	Tyr	Glu	Val	Asn	Val	Arg
			180					185					190		
Phe	Leu	Thr	Pro	Val	Pro	Gly	Asn	Trp	Val	Tyr	Ile	Ile	Asp	Ala	Thr
		195					200					205			
Asp	Gly	Ala	Ile	Leu	Asn	Lys	Phe	Asn	Gln	Ile	Asp	Ser	Arg	Gln	Pro
	210					215					220				
Gly	Gly	Gly	Gln	Pro	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Thr	Val	Gly	Val	Gly	Arg
225					230						235			240	
Gly	Val	Leu	Gly	Asp	Gln	Lys	Tyr	Ile	Asn	Thr	Thr	Tyr	Ser	Ser	Tyr
				245					250					255	
Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	Gln	Asp	Asn	Thr	Arg	Gly	Ser	Gly	Ile	Phe
			260					265					270		
Thr	Tyr	Asp	Gly	Arg	Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Leu	Trp	Thr
		275					280					285			
Asp	Gly	Asp	Asn	Gln	Phe	Thr	Ala	Ser	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ala	Val	Asp
	290					295					300				
Ala	His	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Val	Val	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Val	His
305					310					315				320	
Gly	Arg	Leu	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Ala	Ala	Ile	Arg	Ser	Thr	Val
				325					330					335	
His	Tyr	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Phe	Trp	Asn	Gly	Ser	Gln	Met
			340					345					350		
Val	Tyr	Gly	Asp	Gly	Asp	Gly	Gln	Thr	Phe	Leu	Pro	Phe	Ser	Gly	Gly
		355					360					365			
Ile	Asp	Val	Val	Gly	His	Glu	Leu	Thr	His	Ala	Val	Thr	Asp	Tyr	Thr
	370					375					380				
Ala	Gly	Leu	Val	Tyr	Gln	Asn	Glu	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Glu	Ala	Met
385					390					395				400	
Ser	Asp	Ile	Phe	Gly	Thr	Leu	Val	Glu	Phe	Tyr	Ala	Asn	Arg	Asn	Pro
				405					410					415	
Asp	Trp	Glu	Ile	Gly	Glu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Pro	Gly	Val	Ala	Gly	Asp
		420						425				430			
Ala	Leu	Arg	Ser	Met	Ser	Asp	Pro	Ala	Lys	Tyr	Gly	Asp	Pro	Asp	His
		435					440					445			
Tyr	Ser	Lys	Arg	Tyr	Thr	Gly	Thr	Gln	Asp	Asn	Gly	Gly	Val	His	Thr
	450					455					460				
Asn	Ser	Gly	Ile	Ile	Asn	Lys	Ala	Ala	Tyr	Leu	Ser	Gln	Gly	Gly	
465					470					475				480	
Val	His	Tyr	Gly	Val	Ser	Val	Asn	Gly	Ile	Gly	Arg	Asp	Lys	Met	Gly
				485					490					495	
Lys	Ile	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Val	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Pro	Thr	Ser	Asn
		500						505					510		
Phe	Ser	Gln	Leu	Arg	Ala	Ala	Cys	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Tyr
		515					520					525			
Gly	Ser	Thr	Ser	Gln	Glu	Val	Asn	Ser	Val	Lys	Gln	Ala	Phe	Asn	Ala
	530					535					540				
Val	Gly	Val	Tyr												
545															

<210> 177
 <211> 544
 <212> PRT
 <213> Bacillus caldolyticus

5

<400> 177

```

Met Asn Lys Arg Ala Met Leu Gly Ala Ile Gly Leu Ala Phe Gly Leu
1      5      10      15
Met Ala Trp Pro Phe Gly Ala Ser Ala Lys Gly Lys Ser Met Val Trp
20     25     30
Asn Glu Gln Trp Lys Thr Pro Ser Phe Val Ser Gly Ser Leu Leu Gly
35     40     45
Arg Cys Ser Gln Glu Leu Val Tyr Arg Tyr Leu Asp Gln Glu Lys Asn
50     55     60
Thr Phe Gln Leu Gly Gly Gln Ala Arg Glu Arg Leu Ser Leu Ile Gly
65     70     75     80
Asn Lys Leu Asp Glu Leu Gly His Thr Val Met Arg Phe Glu Gln Ala
85     90     95
Ile Ala Ala Ser Leu Cys Met Gly Ala Val Leu Val Ala His Val Asn
100    105    110
Asp Gly Glu Leu Ser Ser Leu Ser Gly Thr Leu Ile Pro Asn Leu Asp
115    120    125
Lys Arg Thr Leu Lys Thr Glu Ala Ala Ile Ser Ile Gln Gln Ala Glu
130    135    140
Met Ile Ala Lys Gln Asp Val Ala Asp Arg Val Thr Lys Glu Arg Pro
145    150    155    160
Ala Ala Glu Glu Gly Lys Pro Thr Arg Leu Val Ile Tyr Pro Asp Glu
165    170    175
Glu Thr Pro Arg Leu Ala Tyr Glu Val Asn Val Arg Phe Leu Thr Pro
180    185    190
Val Pro Gly Asn Trp Ile Tyr Met Ile Asp Ala Ala Asp Gly Lys Val
195    200    205
Leu Asn Lys Trp Asn Gln Met Asp Glu Ala Lys Pro Gly Gly Ala Gln
210    215    220
Pro Val Ala Gly Thr Ser Thr Val Gly Val Gly Arg Gly Val Leu Gly
225    230    235    240
Asp Gln Lys Tyr Ile Asn Thr Thr Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr
245    250    255
Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Ser Gly Ile Phe Thr Tyr Asp Gly
260    265    270
Arg Asn Arg Thr Val Leu Pro Gly Ser Leu Trp Ala Asp Gly Asp Asn
275    280    285
Gln Phe Phe Ala Ser Tyr Asp Ala Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Tyr
290    295    300
Ala Gly Val Val Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Val His Gly Arg Leu Ser
305    310    315    320
Tyr Asp Gly Ser Asn Ala Ala Ile Arg Ser Thr Val His Tyr Gly Arg
325    330    335
Gly Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met Val Tyr Gly Asp
340    345    350
Gly Asp Gly Gln Thr Phe Leu Pro Phe Ser Gly Gly Ile Asp Val Val
355    360    365
Gly His Glu Leu Thr His Ala Val Thr Asp Tyr Thr Ala Gly Leu Val
370    375    380
Tyr Gln Asn Glu Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ala Met Ser Asp Ile Phe
385    390    395    400
    
```

Gly Thr Leu Val Glu Phe Tyr Ala Asn Arg Asn Pro Asp Trp Glu Ile
 405 410 415
 Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Pro Gly Val Ala Gly Asp Ala Leu Arg Ser
 420 425 430
 Met Ser Asp Pro Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His Tyr Ser Lys Arg
 435 440 445
 Tyr Thr Gly Thr Gln Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile
 450 455 460
 Ile Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Leu Ser Gln Gly Gly Val His Tyr Gly
 465 470 475 480
 Val Ser Val Thr Gly Ile Gly Arg Asp Lys Met Gly Lys Ile Phe Tyr
 485 490 495
 Arg Ala Leu Val Tyr Tyr Leu Thr Pro Thr Ser Asn Phe Ser Gln Leu
 500 505 510
 Arg Ala Ala Cys Val Gln Ala Ala Asp Leu Tyr Gly Ser Thr Ser
 515 520 525
 Gln Glu Val Asn Ser Val Lys Gln Ala Phe Asn Ala Val Gly Val Tyr
 530 535 540

<210> 178

<211> 566

5 <212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 178

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

10

ES 2 529 815 T3

Gly Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Asn Thr Thr
 260 265 270
 Leu Ser Ser Ser Tyr Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Ala Thr
 275 280 285
 Ile Phe Thr Tyr Asp Ala Lys Asn Arg Thr Thr Leu Pro Gly Thr Leu
 290 295 300
 Trp Val Asp Ala Asp Asn Val Phe Asn Ala Ala Tyr Asp Ala Ala Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Ala
 325 330 335
 Thr Phe Asn Arg Asn Ser Ile Asn Asp Ala Gly Ala Pro Leu Lys Ser
 340 345 350
 Thr Val His Tyr Gly Ser Lys Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser
 355 360 365
 Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Val Thr Phe Thr Ser Leu Ser
 370 375 380
 Gly Gly Ile Asp Val Ile Gly His Glu Leu Thr His Ala Val Thr Glu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Ser Asp Leu Ile Tyr Gln Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu
 405 410 415
 Ala Ile Ser Asp Val Phe Gly Thr Leu Val Glu Phe Tyr Asp Asn Arg
 420 425 430
 Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Pro Gly Lys Ala
 435 440 445
 Gly Asp Ala Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro Thr Lys Tyr Gly Asp Pro
 450 455 460
 Asp His Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Thr Ser Asp Asn Gly Gly Val
 465 470 475 480
 His Thr Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Gln Ala Tyr Leu Leu Ala Asn
 485 490 495
 Gly Gly Thr His Tyr Gly Val Thr Val Thr Gly Ile Gly Lys Asp Lys
 500 505 510
 Leu Gly Ala Ile Tyr Tyr Arg Ala Asn Thr Gln Tyr Phe Thr Gln Ser
 515 520 525
 Thr Thr Phe Ser Gln Ala Arg Ala Gly Ala Val Gln Ala Ala Ala Asp
 530 535 540
 Leu Tyr Gly Ala Asn Ser Ala Glu Val Asn Ala Val Lys Gln Ser Phe
 545 550 555 560
 Ser Ala Val Gly Ile Asn
 565

<210> 179

<211> 566

5 <212> PRT

<213> Bacillus cereus

<400> 179

Met Lys Lys Lys Ser Leu Ala Leu Val Leu Ala Thr Gly Met Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Thr Phe Gly Gly Thr Gly Ser Ala Phe Ala Asp Ser Lys Asn Val
 20 25 30
 Leu Ser Thr Lys Lys Tyr Asn Glu Thr Val Gln Ser Pro Glu Phe Ile
 35 40 45
 Ser Gly Asp Leu Thr Glu Ala Thr Gly Lys Lys Ala Glu Ser Val Val
 50 55 60
 Phe Asp Tyr Leu Asn Ala Ala Lys Gly Asp Tyr Lys Leu Gly Glu Lys
 65 70 75 80

10

```

Ser Ala Gln Asp Ser Phe Lys Val Lys Gln Val Lys Lys Asp Ala Val
      85      90      95
Thr Asp Ser Thr Val Val Arg Met Gln Gln Val Tyr Glu Gly Val Pro
      100     105     110
Val Trp Gly Ser Thr Gln Val Ala His Val Ser Lys Asp Gly Ser Leu
      115     120     125
Lys Val Leu Ser Gly Thr Val Ala Pro Asp Leu Asp Lys Lys Glu Lys
      130     135     140
Leu Lys Asn Lys Asn Lys Ile Glu Gly Ala Lys Ala Ile Glu Ile Ala
      145     150     155     160
Gln Gln Asp Leu Gly Val Thr Pro Lys Tyr Glu Val Glu Pro Lys Ala
      165     170     175
Asp Leu Tyr Val Tyr Gln Asn Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Tyr Val
      180     185     190
Val Asn Leu Asn Phe Leu Asp Pro Ser Pro Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe
      195     200     205
Ile Glu Ala Asp Ser Gly Lys Val Leu Asn Lys Phe Asn Thr Ile Asp
      210     215     220
His Val Thr Asn Asp Asp Lys Ser Pro Val Lys Gln Glu Ala Pro Lys
      225     230     235     240
Gln Asp Ala Lys Ala Val Val Lys Pro Val Thr Gly Thr Asn Lys Val
      245     250     255
Gly Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Asn Thr Thr
      260     265     270
Leu Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Ala Thr
      275     280     285
Ile Phe Thr Tyr Asp Ala Lys Asn Arg Ser Thr Leu Pro Gly Thr Leu
      290     295     300
Trp Ala Asp Ala Asp Asn Val Phe Asn Ala Ala Tyr Asp Ala Ala Ala
      305     310     315     320
Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Ala
      325     330     335
Thr Phe Asn Arg Asn Ser Ile Asn Asp Ala Gly Ala Pro Leu Lys Ser
      340     345     350
Thr Val His Tyr Gly Ser Asn Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser
      355     360     365
Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Val Thr Phe Thr Ser Leu Ser
      370     375     380
Gly Gly Ile Asp Val Ile Gly His Glu Leu Thr His Ala Val Thr Glu
      385     390     395     400
Asn Ser Ser Asn Leu Ile Tyr Gln Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu
      405     410     415
Ala Ile Ser Asp Ile Phe Gly Thr Leu Val Glu Phe Tyr Asp Asn Arg
      420     425     430
Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Pro Gly Lys Ala
      435     440     445
Gly Asp Ala Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro Thr Lys Tyr Gly Asp Pro
      450     455     460
Asp His Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Val
      465     470     475     480
His Thr Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Gln Ala Tyr Leu Leu Ala Asn
      485     490     495
Gly Gly Thr His Tyr Gly Val Thr Val Thr Gly Ile Gly Lys Asp Lys
      500     505     510
Leu Gly Ala Ile Tyr Tyr Arg Ala Asn Thr Gln Tyr Phe Thr Gln Ser
      515     520     525
Thr Thr Phe Ser Gln Ala Arg Ala Gly Ala Val Gln Ala Ala Ala Asp
      530     535     540
Leu Tyr Gly Ala Asn Ser Ala Glu Val Ala Ala Val Lys Gln Ser Phe
      545     550     555     560
Ser Ala Val Gly Val Asn
      565

```

<210> 180

<211> 538

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 180

ES 2 529 815 T3

```

Met Arg Asn Leu Thr Lys Thr Ser Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys Thr
1      5      10      15
Ala Ala Gln Met Val Phe Val Thr His Ala Ser Ala Glu Glu Ser Ile
20      25      30
Glu Tyr Asp His Thr Tyr Gln Thr Pro Ser Tyr Ile Ile Glu Lys Ser
35      40      45
Pro Gln Lys Pro Val Gln Asn Thr Thr Gln Lys Glu Ser Leu Phe Ser
50      55      60
Tyr Leu Asp Lys His Gln Thr Gln Phe Lys Leu Lys Gly Asn Ala Asn
65      70      75      80
Ser His Phe Arg Val Ser Lys Thr Ile Lys Asp Pro Lys Thr Lys Gln
85      90      95
Thr Phe Phe Lys Leu Thr Glu Val Tyr Lys Gly Ile Pro Ile Tyr Gly
100      105      110
Phe Glu Gln Ala Val Ala Met Lys Glu Asn Lys Gln Val Lys Ser Phe
115      120      125
Phe Gly Lys Val His Pro Gln Ile Lys Asp Val Ser Val Thr Pro Ser
130      135      140
Ile Ser Glu Lys Lys Ala Ile His Thr Ala Arg Arg Glu Leu Glu Ala
145      150      155      160
Ser Ile Gly Lys Ile Glu Tyr Leu Asp Gly Glu Pro Lys Gly Glu Leu
165      170      175
Tyr Ile Tyr Pro His Asp Gly Glu Tyr Asp Leu Ala Tyr Leu Val Arg
180      185      190
Leu Ser Thr Ser Glu Pro Glu Pro Gly Tyr Trp His Tyr Phe Ile Asp
195      200      205
Ala Lys Asn Gly Lys Val Ile Glu Ser Phe Asn Ala Ile His Glu Ala
210      215      220
Ala Gly Thr Gly Ile Gly Val Ser Gly Asp Glu Lys Ser Phe Asp Val
225      230      235      240
Thr Glu Gln Asn Gly Arg Phe Tyr Leu Ala Asp Glu Thr Arg Gly Lys
245      250      255
Gly Ile Asn Thr Phe Asp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Thr Leu Phe Thr
260      265      270
Leu Leu Ser Gln Leu Ile Gly Tyr Thr Gly Lys Glu Ile Val Ser Gly
275      280      285
Thr Ser Val Phe Asn Glu Pro Ala Ala Val Asp Ala His Ala Asn Ala
290      295      300
Gln Ala Val Tyr Asp Tyr Tyr Ser Lys Thr Phe Gly Arg Asp Ser Phe
305      310      315      320
Asp Gln Asn Gly Ala Arg Ile Thr Ser Thr Val His Val Gly Lys Gln
325      330      335
Trp Asn Asn Ala Ala Trp Asn Gly Val Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly
340      345      350
Asp Gly Ser Lys Phe Lys Pro Leu Ser Gly Ser Leu Asp Ile Val Ala
355      360      365
His Glu Ile Thr His Ala Val Thr Gln Tyr Ser Ala Gly Leu Leu Tyr
370      375      380
Gln Gly Glu Pro Gly Ala Leu Asn Glu Ser Ile Ser Asp Ile Met Gly
385      390      395      400
Ala Met Ala Asp Arg Asp Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Val Tyr Thr
405      410      415
Pro Gly Ile Ala Gly Asp Ser Leu Arg Ser Leu Glu Asp Pro Ser Lys
420      425      430
Gln Gly Asn Pro Asp His Tyr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Thr Glu Asp
435      440      445
Tyr Gly Gly Val His Ile Asn Ser Ser Ile His Asn Lys Ala Ala Tyr
450      455      460
Leu Leu Ala Glu Gly Gly Val His His Gly Val Gln Val Glu Gly Ile
465      470      475      480
Gly Arg Glu Ala Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr
485      490      495
Val Thr Ala Ser Thr Asp Phe Ser Met Met Lys Gln Ala Ala Ile Glu
500      505      510
Ala Ala Asn Asp Leu Tyr Gly Glu Gly Ser Lys Gln Ser Ala Ser Val
515      520      525
Glu Lys Ala Tyr Glu Ala Val Gly Ile Leu
530      535

```

<210> 181

<211> 568

<212> PRT

<213> Bacillus cereus

<400> 181

```

Met Lys Asn Lys Lys Asn Phe Val Lys Ile Gly Leu Thr Thr Gly Val
1      5      10      15
Met Leu Ser Val Ile Met Pro Tyr Gly Asp Ala Tyr Ala Ala Thr Glu
20      25      30
Asp Leu Lys Val Glu Thr Lys Glu Asp Thr Phe Arg Thr Gly Asn Leu
35      40      45
Thr Val Pro Ser Gln Lys Ser Ala Glu Asn Val Ala Lys Asp Ala Leu
50      55      60
Lys Gly Lys Thr Glu Gln Ala Leu Ser Ser Lys Gln Val Asn Thr Glu
65      70      75      80
Ser Lys Val Asn Tyr Asn Val Thr Gln Ser Arg Lys Ser Tyr Asp Gly
85      90      95
Thr Thr Leu Val Arg Leu Gln Gln Thr Tyr Glu Gly Arg Asp Val Tyr
100      105      110
Gly Tyr Gln Leu Thr Ala His Ile Asn Asp Asp Gly Val Leu Thr Ser
115      120      125
Val Ser Gly Asp Ser Ala Gln Asp Leu Gln Gln Gln Glu Asp Leu Lys
130      135      140
Gln Pro Ile Thr Leu Ser Glu Glu Asp Ala Lys Lys Gln Leu Phe Lys
145      150      155      160
Ile Tyr Gly Asp Asn Leu Thr Phe Val Glu Glu Pro Glu Ile Lys Gln
165      170      175
Val Val Tyr Val Asp Glu Asn Thr Asn Lys Ala Thr Ser Ala Tyr Gln
180      185      190
Ile Thr Phe Ser Ala Ser Thr Pro Glu Tyr Val Ser Gly Thr Val Leu
195      200      205
Ile Asp Ala Phe Val Gly Asp Leu Leu Lys Glu Leu Val Gln Lys Leu
210      215      220
Gly Ile Gln Val Asp Ser Ser Ile Val Gln Ser Ala Thr Ser Asn Lys
225      230      235      240
Ser Gln Asp Pro Ser Lys Leu Thr Gly Thr Gly Lys Asp Asp Leu Gly
245      250      255
Met Asn Arg Thr Phe Gly Ile Ser Gln Arg Ser Asp Gly Thr Tyr Thr
260      265      270
Leu Ala Asp Tyr Ser Arg Gly Lys Gly Ile Glu Thr Tyr Thr Ala Asn
275      280      285
Tyr Lys Asp Tyr Asn Asn Tyr Arg Arg Asn Ile Trp Gly Tyr Leu Asp
290      295      300
Asp Leu Val Thr Ser Asn Ser Thr Asn Phe Thr Asp Pro Lys Ala Val
305      310      315      320
Ser Ala His Tyr Leu Ala Thr Lys Val Tyr Asp Phe Tyr Gln Glu Lys
325      330      335
Tyr Ser Arg Asn Ser Phe Asp Asn Asn Gly Gln Lys Val Ile Ser Val
340      345      350
Val His Gly Trp Asn Thr Asn Gly Thr Asn Lys Gly Asn Pro Lys Gln
355      360      365
Trp Phe Asn Ala Phe Ser Asn Gly Ala Met Leu Val Tyr Gly Asp Pro
370      375      380
Ile Val Arg Ala Phe Asp Val Ala Gly His Glu Phe Thr His Ala Val
385      390      395      400
Thr Arg Asn Glu Ser Gly Leu Glu Tyr Ala Gly Glu Ala Gly Ala Ile
405      410      415
Asn Glu Ala Ile Ser Asp Ile Leu Gly Val Ala Val Glu Lys Tyr Ala
420      425      430
Asn Asn Gly Lys Phe Asn Trp Thr Met Gly Glu Gln Ser Gly Arg Ile
435      440      445
Phe Arg Asp Met Lys Asn Pro Ser Ser Ile Ser Ser Arg Tyr Pro Glu
450      455      460
Asp Tyr Arg His Tyr Asn Asn Leu Pro Ile Asp Ala Ala His Asp His
465      470      475      480
Gly Gly Val His Thr Asn Ser Ser Ile Ile Asn Lys Val Ala Tyr Leu
485      490      495
Ile Ala Ser Gly Asn His Asn Gly Val Asn Val Gln Gly Ile Gly
500      505      510
Glu Asp Lys Met Phe Asp Ile Phe Tyr Tyr Ala Asn Thr Asp Glu Leu
515      520      525
Asn Met Thr Ser Asp Phe Lys Glu Leu Lys Glu Ala Cys Ile Arg Val
530      535      540
Ala Thr Asn Leu Tyr Gly Lys Asp Ser Ser Glu Val Gln Ala Val Gln
545      550      555      560
Gln Ala Phe Lys Ala Ala Tyr Ile
565

```

ES 2 529 815 T3

<210> 182
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Bacillus thermoproteolyticus

5

<400> 182

```

Ile Thr Gly Thr Ser Thr Val Gly Val Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp
1      5      10      15
Gln Lys Asn Ile Asn Thr Thr Tyr Ser Thr Tyr Tyr Tyr Leu Gln Asp
      20      25      30
Asn Thr Arg Gly Asn Gly Ile Phe Thr Tyr Asp Ala Lys Tyr Arg Thr
      35      40      45
Thr Leu Pro Gly Ser Leu Trp Ala Asp Ala Asp Asn Gln Phe Phe Ala
      50      55      60
Ser Tyr Asp Ala Pro Ala Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr
65      70      75      80
Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Val His Asn Arg Leu Ser Tyr Asp Gly Asn
      85      90      95
Asn Ala Ala Ile Arg Ser Ser Val His Tyr Ser Gln Gly Tyr Asn Asn
      100     105     110
Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Gln
      115     120     125
Thr Phe Ile Pro Leu Ser Gly Gly Ile Asp Val Val Ala His Glu Leu
130     135     140
Thr His Ala Val Thr Asp Tyr Thr Ala Gly Leu Ile Tyr Gln Asn Glu
145     150     155     160
Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Asp Ile Phe Gly Thr Leu Val
      165     170     175
Lys Phe Tyr Ala Asn Lys Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Val
      180     185     190
Tyr Thr Pro Gly Ile Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro
      195     200     205
Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Thr
210     215     220
Gln Asp Asn Gly Gly Val His Ile Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Ala
225     230     235     240
Ala Tyr Leu Ile Ser Gln Gly Gly Thr His Tyr Gly Val Ser Val Val
      245     250     255
Gly Ile Gly Arg Asp Lys Leu Gly Lys Ile Phe Tyr Arg Ala Leu Thr
260     265     270
Gln Tyr Leu Thr Pro Thr Ser Asn Phe Ser Gln Leu Arg Ala Ala Ala
275     280     285
Val Gln Ser Ala Thr Asp Leu Tyr Gly Ser Thr Ser Gln Glu Val Ala
290     295     300
Ser Val Lys Gln Ala Phe Asp Ala Val Gly Val Lys
305     310     315

```

10

<210> 183
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Bacillus stearothermophilis

15

<400> 183

```

Ile Thr Gly Thr Ser Thr Val Gly Val Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp
1      5      10      15
Gln Lys Asn Ile Asn Thr Thr Tyr Ser Thr Tyr Tyr Tyr Leu Gln Asp
      20      25      30
Asn Thr Arg Gly Asn Gly Ile Phe Thr Tyr Asp Ala Lys Tyr Arg Thr
      35      40      45
Thr Leu Pro Gly Ser Leu Trp Ala Asp Ala Asp Asn Gln Phe Phe Ala
      50      55      60
Ser Tyr Asp Ala Pro Ala Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr
65      70      75      80
Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Val His Asn Arg Leu Ser Tyr Asp Gly Asn
      85      90      95
Asn Ala Ala Ile Arg Ser Ser Val His Tyr Ser Gln Gly Tyr Asn Asn
      100     105     110
Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Gln
      115     120     125
Thr Phe Ile Pro Leu Ser Gly Gly Ile Asp Val Val Ala His Glu Leu
130     135     140
Thr His Ala Val Thr Asp Tyr Thr Ala Gly Leu Ile Tyr Gln Asn Glu
145     150     155     160
Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Asp Ile Phe Gly Thr Leu Val
      165     170     175
Glu Phe Tyr Ala Asn Lys Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Val
      180     185     190
Tyr Thr Pro Gly Ile Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro
195     200     205
Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Thr
210     215     220
Gln Asp Asn Gly Gly Val His Ile Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Ala
225     230     235     240
Ala Tyr Leu Ile Ser Gln Gly Gly Thr His Tyr Gly Val Ser Val Val
      245     250     255
Gly Ile Gly Arg Asp Lys Leu Gly Lys Ile Phe Tyr Arg Ala Leu Thr
260     265     270
Gln Tyr Leu Thr Pro Thr Ser Asn Phe Ser Gln Leu Arg Ala Ala Ala
275     280     285
Val Gln Ser Ala Thr Asp Leu Tyr Gly Ser Thr Ser Gln Glu Val Ala
290     295     300
Ser Val Lys Gln Ala Phe Asp Ala Val Gly Val Lys
305     310     315

```

<210> 184

<211> 319

<212> PRT

<213> Bacillus caldoyticus

<400> 184

ES 2 529 815 T3

Val	Ala	Gly	Thr	Ser	Thr	Val	Gly	Val	Gly	Arg	Gly	Val	Leu	Gly	Asp
1				5					10				15		
Gln	Lys	Tyr	Ile	Asn	Thr	Thr	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr
			20					25					30		
Leu	Gln	Asp	Asn	Thr	Arg	Gly	Ser	Gly	Ile	Phe	Thr	Tyr	Asp	Gly	Arg
		35				40						45			
Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Leu	Trp	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Gln
		50				55					60				
Phe	Phe	Ala	Ser	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	His	Tyr	Tyr	Ala
65					70				75					80	
Gly	Val	Val	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Val	His	Gly	Arg	Leu	Ser	Tyr
				85					90				95		
Asp	Gly	Ser	Asn	Ala	Ala	Ile	Arg	Ser	Thr	Val	His	Tyr	Gly	Arg	Gly
			100					105					110		
Tyr	Asn	Asn	Ala	Phe	Trp	Asn	Gly	Ser	Gln	Met	Val	Tyr	Gly	Asp	Gly
		115				120						125			
Asp	Gly	Gln	Thr	Phe	Leu	Pro	Phe	Ser	Gly	Gly	Ile	Asp	Val	Val	Gly
		130				135					140				
His	Glu	Leu	Thr	His	Ala	Val	Thr	Asp	Tyr	Thr	Ala	Gly	Leu	Val	Tyr
145					150					155				160	
Gln	Asn	Glu	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Glu	Ala	Met	Ser	Asp	Ile	Phe	Gly
				165					170				175		
Thr	Leu	Val	Glu	Phe	Tyr	Ala	Asn	Arg	Asn	Pro	Asp	Trp	Glu	Ile	Gly
			180					185					190		
Glu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Pro	Gly	Val	Ala	Gly	Asp	Ala	Leu	Arg	Ser	Met
			195				200					205			
Ser	Asp	Pro	Ala	Lys	Tyr	Gly	Asp	Pro	Asp	His	Tyr	Ser	Lys	Arg	Tyr
	210					215					220				
Thr	Gly	Thr	Gln	Asp	Asn	Gly	Gly	Val	His	Thr	Asn	Ser	Gly	Ile	Ile
225					230					235				240	
Asn	Lys	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Gln	Gly	Gly	Val	His	Tyr	Gly	Val
				245						250				255	
Ser	Val	Thr	Gly	Ile	Gly	Arg	Asp	Lys	Met	Gly	Lys	Ile	Phe	Tyr	Arg
			260					265					270		
Ala	Leu	Val	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Pro	Thr	Ser	Asn	Phe	Ser	Gln	Leu	Arg
		275					280					285			
Ala	Ala	Cys	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ser	Thr	Ser	Gln
		290				295					300				
Glu	Val	Asn	Ser	Val	Lys	Gln	Ala	Phe	Asn	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	
305					310					315					

5 <210> 185
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Bacillus cereus

10 <400> 185

ES 2 529 815 T3

Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Gly	Lys	Gly	Val	Leu	Gly	Asp
1				5					10					15	
Thr	Lys	Ser	Leu	Asn	Thr	Thr	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Gln
			20					25					30		
Asp	Asn	Thr	Arg	Gly	Ala	Thr	Ile	Phe	Thr	Tyr	Asp	Ala	Lys	Asn	Arg
		35				40					45				
Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Leu	Trp	Ala	Asp	Ala	Asp	Asn	Val	Phe	Asn
	50					55				60					
Ala	Ala	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	His	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Lys
65				70					75					80	
Thr	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Thr	Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Ile	Asn	Asp
				85				90					95		
Ala	Gly	Ala	Pro	Leu	Lys	Ser	Thr	Val	His	Tyr	Gly	Ser	Asn	Tyr	Asn
			100				105						110		
Asn	Ala	Phe	Trp	Asn	Gly	Ser	Gln	Met	Val	Tyr	Gly	Asp	Gly	Asp	Gly
	115					120						125			
Val	Thr	Phe	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Ile	Asp	Val	Ile	Gly	His	Glu
	130				135						140				
Leu	Thr	His	Ala	Val	Thr	Glu	Asn	Ser	Ser	Asn	Leu	Ile	Tyr	Gln	Asn
145					150					155				160	
Glu	Ser	Gly	Ala	Leu	Asn	Glu	Ala	Ile	Ser	Asp	Ile	Phe	Gly	Thr	Leu
				165				170					175		
Val	Glu	Phe	Tyr	Asp	Asn	Arg	Asn	Pro	Asp	Trp	Glu	Ile	Gly	Glu	Asp
		180					185					190			
Ile	Tyr	Thr	Pro	Gly	Lys	Ala	Gly	Asp	Ala	Leu	Arg	Ser	Met	Ser	Asp
	195					200						205			
Pro	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asp	Pro	Asp	His	Tyr	Ser	Lys	Arg	Tyr	Thr	Gly
	210				215						220				
Ser	Ser	Asp	Asn	Gly	Gly	Val	His	Thr	Asn	Ser	Gly	Ile	Ile	Asn	Lys
225				230					235					240	
Gln	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	His	Tyr	Gly	Val	Thr	Val
				245				250					255		
Thr	Gly	Ile	Gly	Lys	Asp	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Asn
			260				265					270			
Thr	Gln	Tyr	Phe	Thr	Gln	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Gln	Ala	Arg	Ala	Gly
			275				280					285			
Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ala	Asn	Ser	Ala	Glu	Val
	290					295					300				
Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Val	Asn			
305					310					315					

5 <210> 186
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Bacillus brevis

10 <400> 186

ES 2 529 815 T3

```

Val Thr Ala Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Gln Phe Glu
1      5      10      15
Thr Thr Lys Gln Gly Ser Thr Tyr Met Leu Lys Asp Thr Thr Arg Gly
20      25      30
Lys Gly Ile Glu Thr Tyr Thr Ala Asn Asn Arg Thr Ser Leu Pro Gly
35      40      45
Thr Leu Met Thr Asp Ser Asp Asn Tyr Trp Thr Asp Gly Ala Ala Val
50      55      60
Asp Ala His Ala His Ala Gln Lys Thr Tyr Asp Tyr Phe Arg Asn Val
65      70      75      80
His Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Gly Asn Gly Ala Val Ile Arg Ser Thr
85      90      95
Val His Tyr Ser Thr Arg Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln
100     105     110
Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Thr Thr Phe Leu Pro Leu Ser Gly
115     120     125
Gly Leu Asp Val Val Ala His Glu Leu Thr His Ala Val Thr Glu Arg
130     135     140
Thr Ala Gly Leu Val Tyr Gln Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ser
145     150     155     160
Met Ser Asp Ile Phe Gly Ala Met Val Asp Asn Asp Asp Trp Leu Met
165     170     175
Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Pro Gly Arg Ser Gly Asp Ala Leu Arg Ser
180     185     190
Leu Gln Asp Pro Ala Ala Tyr Gly Asp Pro Asp His Tyr Ser Lys Arg
195     200     205
Tyr Thr Gly Ser Gln Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile
210     215     220
Asn Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Leu Ala Glu Gly Gly Thr His Tyr Gly
225     230     235     240
Val Arg Val Asn Gly Ile Gly Arg Thr Asp Thr Ala Lys Ile Tyr Tyr
245     250     255
His Ala Leu Thr His Tyr Leu Thr Pro Tyr Ser Asn Phe Ser Ala Met
260     265     270
Arg Arg Ala Ala Val Leu Ser Ala Thr Asp Leu Phe Gly Ala Asn Ser
275     280     285
Arg Gln Val Gln Ala Val Asn Ala Ala Tyr Asp Ala Val Gly Val Lys
290     295     300

```

<210> 187

<211> 302

5

<212> PRT

<213> Bacillus polymyxa

<400> 187

ES 2 529 815 T3

```

Ala Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Ser Lys Ser Phe Thr Thr Thr
1      5      10      15
Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Lys Asp Thr Thr Arg Gly Asn Gly
20      25      30
Ile Val Thr Tyr Thr Ala Ser Asn Arg Gln Ser Ile Pro Gly Thr Leu
35      40      45
Leu Thr Asp Ala Asp Asn Val Trp Asn Asp Pro Ala Gly Val Asp Ala
50      55      60
His Ala Tyr Ala Ala Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Ser Lys Phe Gly
65      70      75      80
Arg Asn Ser Ile Asp Gly Arg Gly Leu Gln Leu Arg Ser Thr Val His
85      90      95
Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met Thr
100      105      110
Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Asp Gly Ser Thr Phe Ile Ala Phe Ser Gly
115      120      125
Asp Pro Asp Val Val Gly His Glu Leu Thr His Gly Val Thr Glu Tyr
130      135      140
Thr Ser Asn Leu Glu Tyr Tyr Gly Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala
145      150      155      160
Phe Ser Asp Val Ile Gly Asn Asp Ile Gln Arg Lys Asn Trp Leu Val
165      170      175
Gly Asp Asp Ile Tyr Thr Pro Asn Ile Cys Gly Asp Ala Leu Arg Ser
180      185      190
Met Ser Asn Pro Thr Leu Tyr Asp Gln Pro His His Tyr Ser Asn Leu
195      200      205
Tyr Lys Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile
210      215      220
Ile Asn Lys Ala Tyr Tyr Leu Leu Ala Gln Gly Gly Thr Phe His Gly
225      230      235      240
Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Arg Asp Ala Ala Val Gln Ile Tyr Tyr
245      250      255
Ser Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Thr Ser Ser Ser Asp Phe Ser Asn Ala
260      265      270
Arg Ala Ala Val Ile Gln Ala Ala Lys Asp Leu Tyr Gly Ala Asn Ser
275      280      285
Ala Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Phe Asp Ala Val Gly
290      295      300

```

<210> 188

<211> 300

5 <212> PRT

<213> Bacillus pumilus

<400> 188

```

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

```

10

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

<210> 189

<211> 300

5

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis var.

<400> 189

Ala Ala Ala Thr Gly Ser Gly Thr Thr Leu Lys Gly Ala Thr Val Pro
 1 5 10 15
 Leu Asn Ile Ser Tyr Glu Gly Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser
 20 25 30
 Lys Pro Thr Gly Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Gln
 35 40 45
 Ser Arg Leu Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Lys Thr Phe Thr
 50 55 60
 Ser Ser Ser Gln Arg Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys
 65 70 75 80
 Val Tyr Asp Tyr Phe Tyr Ser Asn Phe Lys Arg Asn Ser Tyr Asp Asn
 85 90 95
 Lys Gly Ser Lys Ile Val Ser Ser Val His Tyr Gly Thr Gln Tyr Asn
 100 105 110
 Asn Ala Ala Trp Thr Gly Asp Gln Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Gly
 115 120 125
 Ser Phe Phe Ser Pro Leu Ser Gly Ser Leu Asp Val Thr Ala His Glu
 130 135 140
 Met Thr His Gly Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Ile Tyr Glu Asn
 145 150 155 160
 Gln Pro Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr Phe
 165 170 175
 Asn Asp Thr Glu Asp Trp Asp Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Gln
 180 185 190
 Pro Ala Leu Arg Ser Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Asn Gln Pro Asp
 195 200 205
 Asn Tyr Ala Asn Tyr Arg Asn Leu Pro Asn Thr Asp Glu Gly Asp Tyr
 210 215 220
 Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn Lys Ala Ala Tyr Asn
 225 230 235 240
 Thr Ile Thr Lys Leu Gly Val Ser Lys Ser Gln Gln Ile Tyr Tyr Arg
 245 250 255
 Ala Leu Thr Thr Tyr Leu Thr Pro Ser Ser Thr Phe Lys Asp Ala Lys
 260 265 270
 Ala Ala Leu Ile Gln Ser Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Thr Asp Ala
 275 280 285
 Ala Lys Val Glu Ala Ala Trp Asn Ala Val Gly Leu
 290 295 300

10

ES 2 529 815 T3

<210> 190
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 190

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

10

<210> 191
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

15

<400> 191

```

Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser
1      5      10      15
Leu Asn Ile Ser Ser Glu Ser Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser
20      25      30
Lys Pro Thr Gly Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Glu
35      40      45
Tyr Asn Leu Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Gln Phe Thr
50      55      60
Thr Ser Ser Gln Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys
65      70      75      80
Val Tyr Asp Tyr Phe Tyr Gln Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn
85      90      95
Lys Gly Gly Lys Ile Val Ser Ser Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn
100     105     110
Asn Ala Ala Trp Ile Gly Asp Gln Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Gly
115     120     125
Ser Phe Phe Ser Pro Leu Ser Gly Ser Met Asp Val Thr Ala His Glu
130     135     140
Met Thr His Gly Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Asn Tyr Glu Asn
145     150     155     160
Gln Pro Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr Phe
165     170     175
Asn Asp Thr Glu Asp Trp Asp Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Gln
180     185     190
Pro Ala Leu Arg Ser Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Gln Pro Asp
195     200     205
Asn Phe Lys Asn Tyr Lys Asn Leu Pro Asn Thr Asp Ala Gly Asp Tyr
210     215     220
Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn Lys Ala Ala Tyr Asn
225     230     235     240
Thr Ile Thr Lys Ile Gly Val Asn Lys Ala Glu Gln Ile Tyr Tyr Arg
245     250     255
Ala Leu Thr Val Tyr Leu Thr Pro Ser Ser Thr Phe Lys Asp Ala Lys
260     265     270
Ala Ala Leu Ile Gln Ser Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Gln Asp Ala
275     280     285
Ala Ser Val Glu Ala Ala Trp Asn Ala Val Gly Leu
290     295     300

```

<210> 192

<211> 300

5

<212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 192

```

Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser
1      5      10      15
Leu Asn Ile Ser Ser Glu Ser Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser
20      25      30
Lys Pro Thr Gly Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Glu
35      40      45
Tyr Asn Leu Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Gln Phe Thr
50      55      60
Thr Ser Ser Gln Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys
65      70      75      80
Val Tyr Asp Tyr Phe Tyr Gln Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn

```

10

ES 2 529 815 T3

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

<210> 193

 $\langle 211 \rangle$ 301

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 193

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

ES 2 529 815 T3

```

      180      185      190
Gly Lys Glu Gly Asp Ala Leu Arg Ser Met Ser Asn Pro Glu Gln Phe
      195      200      205
Gly Gln Pro Ser His Met Lys Asp Tyr Val Tyr Thr Glu Lys Asp Asn
      210      215      220
Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn Lys Ala Ala Tyr Asn
      225      230      235
Val Ile Gln Ala Ile Gly Lys Ser Lys Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Arg
      245      250      255
Ala Leu Thr Glu Tyr Leu Thr Ser Asn Ser Asn Phe Lys Asp Leu Lys
      260      265      270
Asp Ala Leu Tyr Gln Ala Ala Lys Asp Leu Tyr Glu Gln Gln Thr Ala
      275      280      285
Glu Gln Val Tyr Glu Ala Trp Asn Glu Val Gly Val Glu
      290      295      300

```

<210> 194

<211> 298

5

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 194

```

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

```

10

```

      275      280      285
Ala Phe Ser Thr Val Gly Val Thr Cys Pro
      290      295

```

<210> 195

15

<211> 317

<212> PRT

<213> Bacillus cereus

<400> 195

Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Gly	Lys	Gly	Val	Leu	Gly	Asp
1				5					10					15	
Thr	Lys	Ser	Leu	Asn	Thr	Thr	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Gln
			20					25					30		
Asp	Asn	Thr	Arg	Gly	Ala	Thr	Ile	Phe	Thr	Tyr	Asp	Ala	Lys	Asn	Arg
		35				40						45			
Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Leu	Trp	Ala	Asp	Ala	Asp	Asn	Val	Phe	Asn
	50					55					60				
Ala	Ala	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	His	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Lys
65					70					75					80
Thr	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Thr	Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Ile	Asn	Asp
				85					90					95	
Ala	Gly	Ala	Pro	Leu	Lys	Ser	Thr	Val	His	Tyr	Gly	Ser	Asn	Tyr	Asn
			100					105					110		
Asn	Ala	Phe	Trp	Asn	Gly	Ser	Gln	Met	Val	Tyr	Gly	Asp	Gly	Asp	Gly
		115					120					125			
Val	Thr	Phe	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Ile	Asp	Val	Ile	Gly	His	Glu
	130						135				140				
Leu	Thr	His	Ala	Val	Thr	Glu	Asn	Ser	Ser	Asn	Leu	Ile	Tyr	Gln	Asn
145					150					155					160
Glu	Ser	Gly	Ala	Leu	Asn	Glu	Ala	Ile	Ser	Asp	Ile	Phe	Gly	Thr	Leu
				165					170					175	
Val	Glu	Phe	Tyr	Asp	Asn	Arg	Asn	Pro	Asp	Trp	Glu	Ile	Gly	Glu	Asp
		180						185					190		
Ile	Tyr	Thr	Pro	Gly	Lys	Ala	Gly	Asp	Ala	Leu	Arg	Ser	Met	Ser	Asp
	195						200					205			
Pro	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asp	Pro	Asp	His	Tyr	Ser	Lys	Arg	Tyr	Thr	Gly
	210					215					220				
Ser	Ser	Asp	Asn	Gly	Gly	Val	His	Thr	Asn	Ser	Gly	Ile	Ile	Asn	Lys
225					230					235					240
Gln	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	His	Tyr	Gly	Val	Thr	Val
				245					250					255	
Thr	Gly	Ile	Gly	Lys	Asp	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Asn
		260						265					270		
Thr	Gln	Tyr	Phe	Thr	Gln	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Gln	Ala	Arg	Ala	Gly
	275						280					285			
Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ala	Asn	Ser	Ala	Glu	Val
	290					295					300				
Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Val	Asn			
305					310					315					

5 <210> 196
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 196
 cgtcttcaac aattgtccat ttcttctgc 30

15 <210> 197
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 197
 25 cagacaattt cttacctaaa cccactcttt accctctcct tttaaaaaa ttc 53

<210> 198
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 198
 10 gaattttttt aaaaggagag ggtaaagagt gggtttaggt aagaaattgt ctg 53
 <210> 199
 <211> 32
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 199
 20 gcttatggat cccgtcggtt cagctgagag ag 32
 <210> 200
 <211> 51
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 200
 gatgtcttgg tcaagttgcg cactctttac cctctcctt taaaaaaatt c 51
 <210> 201
 35 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 201
 gaattttttt aaaaggagag ggtaaagagt gcgcaacttg accaagacat c 51
 <210> 202
 45 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> cebador
 <400> 202
 ccaaggccgg tttttatgt aagcttatag aatgccgaca gcctcatacg 50

ES 2 529 815 T3

<210> 203
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 203
 10 cgtatgaggc tgcggcatt ctataagctt acataaaaaa ccggccttgg 50
 <210> 204
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 204
 aatggtgcat gcaaggagat ggcg 24
 <210> 205
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 205
 cgtcttcaag aattcctcca tttctctg c 31
 <210> 206
 35 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 206
 gcaccaaca ttgcagttt attcactctt taccctctcc tttaaaaaa attc 54
 45 <210> 207
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 207
 gaatttttt aaaaggagag ggtaaagagt gaataaacgt gcaatgttgg gtgc 54

<210> 208
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 208
 10 gcttataagc ttaatatact ccaaccgcgt tg 32
 <210> 209
 <211> 50
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 209
 ccagcatagc gcgttggtc actctttacc ctctcctttt aaaaaaattc 50
 <210> 210
 <211> 50
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 210
 gaattttttt aaaaggagag ggtaaagagt gaacaaacgc gctatgctgg 50
 <210> 211
 35 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 211
 gcttataagc ttaatagaca cccacggcat taaacgcc 38
 45 <210> 212
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 212
 caggacaaga gctaaggact ttttttcac tctttaccct ctcttttaa aaaaattc 58

ES 2 529 815 T3

<210> 213
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 213
 10 gaattttttt aaaaggagag ggtaaagagt gaaaaaaaag tccttagctc ttgtcctg 58
 <210> 214
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 214
 20 gcttataagc ttaattaatg ccgacggcac 30
 <210> 215
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens
 <400> 215
 30 Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu
 1 5 10
 <210> 216
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens
 35 <400> 216
 Asp Ala Gly Asp Tyr Gly Gly Val His Thr
 1 5 10
 <210> 217
 40 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens
 <400> 217
 45 Ala Gly Asp Tyr Gly Gly Val His Thr Asn
 1 5 10
 <210> 218
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens
 <400> 218

ES 2 529 815 T3

Gly Asp Tyr Gly Gly Val His Thr Asn
1 5

<210> 219
<211> 10
5 <212> PRT
<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 219
Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu
1 5 10

10 <210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> Bacillus amyloliquefaciens

15 <400> 220
Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu
1 5 10

<210> 221
<211> 10
<212> PRT
20 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 221
Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Gln Pro
1 5 10

25 <210> 222
<211> 219
<212> PRT
<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 222
Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ile Ser Ser Glu Ser Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser
20 25 30
Lys Pro Thr Gly Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Glu
35 40 45
Tyr Asn Leu Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Gln Phe Thr
50 55 60
Thr Ser Ser Gln Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys
65 70 75 80
Val Tyr Asp Tyr Phe Tyr Gln Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn
85 90 95

30 Lys Gly Gly Lys Ile Val Ser Ser Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn
100 105 110
Asn Ala Ala Trp Ile Gly Asp Gln Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Gly
115 120 125
Ser Phe Phe Ser Pro Leu Ser Gly Ser Met Asp Val Thr Ala His Glu
130 135 140
Met Thr His Gly Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Asn Tyr Glu Asn
145 150 155 160
Gln Pro Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr Phe
165 170 175
Asn Asp Thr Glu Asp Trp Asp Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Gln
180 185 190
Pro Ala Leu Arg Ser Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Gln Pro Asp
195 200 205
Asn Phe Lys Asn Tyr Lys Asn Leu Pro Asn Thr
210 215

<210> 223

<211> 81
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

5 <400> 223

```

Asp Ala Gly Asp Tyr Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Pro Asn
1      5      10      15
Lys Ala Ala Tyr Asn Thr Ile Thr Lys Ile Gly Val Asn Lys Ala Glu
      20      25      30
Gln Ile Tyr Tyr Arg Ala Leu Thr Val Tyr Leu Thr Pro Ser Ser Thr
      35      40      45
Phe Lys Asp Ala Lys Ala Ala Leu Ile Gln Ser Ala Arg Asp Leu Tyr
      50      55      60
Gly Ser Gln Asp Ala Ala Ser Val Glu Ala Ala Trp Asn Ala Val Gly
65      70      75      80
Leu

```

10 <210> 224
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

15 <400> 224

```

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

```

20 <210> 225
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 225

ES 2 529 815 T3

```

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

```

<210> 226

<211> 103

5 <212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 226

```

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

```

10

100

Reivindicaciones

1. Variante de metaloproteasa neutra aislada que presenta al menos un 70 % de identidad de aminoácidos con la metaloproteasa neutra, comprendiendo la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:18 y presentando una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una mutación equivalente a una mutación de una metaloproteasa neutra que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:18, donde dichas mutaciones se seleccionan entre T004C, T004E, T004H, T004I, T004K, T004L, T004M, T004N, T004P, T004R, T004S, T004V, T004W, T004Y, G012D, G012E, G012I, G012K, G012L, G012M, G012Q, G012T, G012V, G012W, K013C, K013D, K013E, K013F, K013G, K013H, K013I, K013L, K013M, K013N, K013Q, K013S, K013T, K013V, K013Y, T014F, T014G, T014H, T014I, T014K, T014L, T014M, T014P, T014Q, T014R, T014S, T014V, T014W, T014Y, S023A, S023D, S023F, S023I, S023K, S023L, S023M, S023N, S023P, S023Q, S023R, S023T, S023V, S023W, S023Y, G024A, G024D, G024F, G024G, G024H, G024I, G024K, G024L, G024M, G024N, G024P, G024R, G024S, G024T, G024V, G024W, G024Y, K033H, Q045C, Q045D, Q045E, Q045F, Q045H, Q045I, Q045K, Q045L, Q045M, Q045N, Q045P, Q045R, Q045T, Q045W, N046A, N046C, N046E, N046F, N046G, N046H, N046I, N046K, N046L, N046M, N046N, N046P, N046Q, N046R, N046S, N046T, N046V, N046W, N046Y, R047E, R047K, R047L, R047M, R47Q, R047S, R047T, Y049A, Y049C, Y049D, Y049E, Y049F, Y049H, Y049I, Y049K, Y049L, Y049N, Y049R, Y049T, Y049V, Y049W, N050D, N050F, N050G, N050H, N050I, N050K, N050L, N050M, N050P, N050Q, N050W, N050Y, T054C, T054D, T054E, T054F, T054G, T054H, T054I, T054K, T054L, T054M, T054N, T054P, T054Q, T054R, T054S, T054V, T054W, T054Y, S058D, S058H, S058I, S058L, S058N, S058P, S058Q, T059A, T059C, T059E, T059G, T059H, T059I, T059K, T059L, T059M, T059N, T059P, T059Q, T059R, T059S, T059V, T059W, T060D, T060F, T060I, T060K, T060L, T060N, T060Q, T060R, T060V, T060W, T060Y, T065C, T065E, T065F, T065H, T065I, T065K, T065L, T065M, T065P, T065Q, T065R, T065V, T065Y, S066C, S066D, S066E, S066F, S066H, S066I, S066K, S066L, S066N, S066P, S066Q, S066R, S066T, S066V, S066W, S066Y, Q087A, Q087D, Q087E, Q087H, Q087I, Q087K, Q087L, Q087M, Q087N, Q087R, Q087T, Q087V, Q087W, N090C, N090D, N090E, N090F, N090G, N090H, N090L, N090R, N090T, N096G, N096H, N096K, N096R, K097H, K097Q, K097W, K100A, K100D, K100E, K100F, K100H, K100N, K100P, K100Q, K100R, K100S, K100V, K100Y, R110A, R110C, R110E, R110H, R110K, R110L, R110M, R110N, R110S, R110Y, D119E, D119H, D119I, D119L, D119M, D119R, D119S, D119T, D119V, D119W, G128C, G128F, G128H, G128K, G128L, G128M, G128N, G128Q, G128R, G128W, G128Y, S129A, S129C, S129D, S129F, S129G, S129H, S129I, S129K, S129L, S129M, S129Q, S129R, S129T, S129V, S129W, S129Y, F130I, F130K, F130L, F130M, F130Q, F130R, F130T, F130V, F130Y, S135P, G136I, G136L, G136P, G136V, G136W, G136Y, S137A, M138I, M138K, M138Q, M138V, D139A, D139C, D139E, D139G, D139H, D139I, D139K, D139L, D139M, D139P, D139R, D139S, D139V, D139W, D139Y, V140C, Q151I, E152A, E152C, E152D, E152F, E152G, E152H, E152L, E152M, E152N, E152R, E152S, E152W, N155D, N155K, N155Q, N155R, D178A, D178C, D178G, D178H, D178I, D178K, D178L, D178M, D178N, D178P, D178Q, D178R, D178S, D178T, D178V, D178W, D178Y, T179A, T179F, T179H, T179I, T179K, T179L, T179M, T179N, T179P, T179Q, T179R, T179S, T179V, T179W, T179Y, E186A, E186C, E186D, E186G, E186H, E186K, E186L, E186M, E186N, E186P, E186Q, E186R, E186S, E186T, E186V, E186W, E186Y, V190H, V190I, V190K, V190L, V190Q, V190R, S191F, S191G, S191H, S191I, S191K, S191L, S191N, S191Q, S191R, S191W, L198M, L198V, S199C, S199D, S199E, S199F, S199I, S 199K, S 199L, S 199N, S199Q, S 199R, S199V, Y204H, Y204T, G205F, G205H, G205L, G205M, G205R, G205S, G205Y, K211C, K211D, K211G, K211M, K211N, K211Q, K211R, K211S, K211T, K211V, K214A, K214C, K214E, K214I, K214L, K214M, K214N, K214Q, K214S, K214V, L216A, L216C, L216F, L216H, L216Q, L216R, L216S, L216Y, N218K, N218P, T219D, D220A, D220E, D220H, D220K, D220N, D220P, A221D, A221F, A221I, A221K, A221L, A221M, A221N, A221S, A221V, A221Y, G222C, G222H, G222N, G222R, Y224F, Y224H, Y224N, Y224R, T243C, T243G, T243H, T243I, T243K, T243L, T243Q, T243R, T243W, T243Y, K244A, K244C, K244D, K244E, K244F, K244G, K244L, K244M, K244N, K244Q, K244S, K244T, K244V, K244W, K244Y, V260A, V260D, V260E, V260G, V260H, V260I, V260K, V260L, V260M, V260P, V260Q, V260R, V260S, V260T, V260W, V260Y, Y261C, Y261F, Y261I, Y261L, T263E, T263F, T263H, T263I, T263L, T263M, T263Q, T263V, T263W, T263Y, S265A, S265C, S265D, S265E, S265K, S265N, S265P, S265Q, S265R, S265T, S265V, S265W, K269E, K269F, K269G, K269H, K269I, K269L, K269M, K269N, K269P, K269Q, K269S, K269T, K269V, K269W, K269Y, A273C, A273D, A273H, A273I, A273K, A273L, A273N, A273Q, A273R, A273Y, R280A, R280C, R280D, R280E, R280F, R280G, R280H, R280K, R280L, R280M, R280S, R280T, R280V, R280W, R280Y, L282F, L282G, L282H, L282I, L282K, L282M, L282N, L282Q, L282R, L282V, L282Y, S285A, S285C, S285D, S285E, S285K, S285P, S285Q, S285R, S285W, Q286A, Q286D, Q286E, Q286K, Q286P, Q286R, A289C, A289D, A289E, A289K, A289L, A289R, A293C, A293R, N296C, N296D, N296E, N296K, N296R, N296

donde dicha identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 18 se determina por medio de un BLAST con parámetros predeterminados;

donde dicha variante de metaloproteasa neutra presenta una termoestabilidad mejorada en comparación con la metaloproteasa neutra natural de *B. amyloliquefaciens* que presenta la secuencia de la SEQ ID NO: 18;

rendimiento mejorado en condiciones de pH inferior o superior, en comparación con la metaloproteasa neutra natural de *B. amyloliquefaciens* que presenta la secuencia de la SEQ ID NO: 18; o

estabilidad autolítica mejorada, en comparación con la metaloproteasa neutra natural de *B. amyloliquefaciens* que presenta la secuencia de la SEQ ID NO: 18.

- 5 2. Metaloproteasa neutra aislada variante según la reivindicación 1, donde dicha proteasa comprende múltiples mutaciones seleccionadas entre S023W/G024M, T004V/S023W/G024W, S023W/G024Y/A288V, T004L/S023W/G024Y, N046Q/N050F/T054L, N050Y/T059R/S129Q, S023W/G024W, A273H/S285P/E292G, S023Y/G024Y, S023Y/G024W, T004S/S023Y/G024W, N046Q/T054K, S023W/G024Y, T004V/S023W, T059K/S066N, N046Q/N050W/T054H/T153A, T004V/S023W/G024Y, L282M/Q286P/A289R,
 - 10 N046Q/R047K/N050Y/T054K, L044Q/T263W/S285R, T004L/S023W/G024W, R047K/N050F/T054K, A273H/S285R, N050Y/T059K/S066Q, T054K/Q192K, N046Q/N050W, L282M/Q286K, T059K/S066Q, T004S/S023W, L282M/Q286R/A289R/K011N, L282M/A289R, N046Q/N050W/T054H, T059K/S129Q, T004S/S023N/G024Y/F210L, T004V/S023W/G024M/A289V, L282M/Q286K/A289R/S132T, N050W/T054H, L282M/Q286R, L282F/Q286K/A289R, T059R/S066Q, R047K/N050W/T054H, S265P/L282M/Q286K/A289R, L282M/Q286R/T229S, L282F/Q286K, T263W/S285R, S265P/L282M/Q286K, T263H/A273H/S285R, T059R/S129V, S032T/T263H/A273H/S285R, T059R/S066Q/S129Q, T004S/G024W, T004V/S023W/G024M, T059K/S066Q/S129Q, L282M/Q286K/A289R/I253V, T004V/S023Y/G024W, T059R/S066N/S129Q, N050F/T054L, T004S/S023N/G024W, T059R/S066N, T059R/S066N/S129V, Q286R/A289R, N046Q/R047K/N050F/T054K, S265P/L282M/Q286P/A289R, S265P/L282M/Q286R/A289R
 - 20 Q062K/S066Q/S129I, S023N/G024W, N046Q/R047K/N050W/T054H, R047K/T054K, T004L/G024W, T014M/T059R/S129V, T059R/S066Q/N092S/S129I, R047K/N050W/T054K, T004V/G024W, N047K/N050F/T054K, S265P/L282F/Q286K/N061Y, L282F/Q286K/E159V, T004V/S023Y/G024M, S265P/L282F/A289R/T065S, T059K/F063L/S066N/S129V, T004L/S023W, N050F/T054H, T059R/S066Q/S129V, V190I/D220E/S265W/L282F, T004S/S023Y/G024M, T004L/S023N/G024Y, T059K/S066N/S129I, T059R/S066N/S129I, L282M/Q286R/A289R/P162S, N046Q/N050F/T179N, T059K/Y082C/S129V, T059K/S129I, N050Y/T054K, T059K/S066Q/V102A/S129Q, T059R/S066Q/S129I, T059W/S066N/S129V/S290R, T059R/S129I, T059K/S066Q/S129I, T059K/S066Q/S129V, S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N, T004V/S023N/G024W, S265P/Q286K, S265P/L282F/A289R, D220P/S265W, L055F/T059W/S129V, T059R/S129Q/S191R, N050W/T054K, T004S/S023W/G024M, R047K/N050F/T054H, T059K/S066N/K088E, T059K/S066Q/S129I/V291L, L282M/Q286R/A289R, T059R/S066N/F085S/S129I, L282F/Q286P/A289R, L282F/Q286R/A289R, G099D/S265P/L282F/Q286K/A289R, N046Q/N050F, N050Y/T059W/S066N/S129V, T0091/D220P/S265N, V190F/D220P/S265W, N157Y/T263W/A273H/S285R, T263W/A273H/S285R, T263W/S285W, T004V/S023Y, N046Q/R047K/N050W, N050W/T054L, N200Y/S265P/L282F/Q286P/A289R, T059R/S066Q/P264Q, T004V/G024Y, T004L/G024Y, N050Y/S191I, N050Y/T054L, T004L/S023W/G024Y/N155K, F169I/L282F/Q286R/A289R, L282M/Q286K/A289R, F130L/M138L/E152W/D183N, N046Q/R047K/N050Y/T054H, T004V/G024M, N050Y/T059W/S066Q/S129V, S023N/G024Y, T054H/P162Q, T004S/S023W/G024Y, N050Y/T054H, L282F/Q286R/A289R/F169I, R047K/N050W, V190F/D220P, L282M/F173Y, T004L/S023Y, N050W/A288D, V190I/D220P/S265Q, S265P/L282F/Q286P/A289R, S265P/L282F/Q286R/A289R, N046Q/N050Y/T054K, T059W/S066Q, T263W/A273H/S285W, T263W/A273H/S285P, S023Y/G024M, T004L/S023N/G024W, T004V/S023N/G024Y, T059W/S066N/S129Q, T004S/S023Y, T004S/S023N/G024M, T059W/S066N/A070T, T059W/S066Q/S129Q, T263W/A273H, A273H/S285P, N046Q/R047K/N050Y/T054L, N046Q/R047K/N050Y, R047K/N050Y, T263H/S285W, R047K/N050F, N046Q/R047K/N050F/T054H, S023N/G024M, T004S/G024Y, R047K/N050Y/T054H, T059W/S066N/S129I, R047K/T054L, T004S/S023W/G024W, M138L/E152F/T146S, D220P/S265N, T004S/G024M, T004V/S023N, N046Q/N050F/T054K, N046Q/N050Y/T054H, Q062H/S066Q/S129Q, T059W/S129Q, T059W/S129V, N050F/T054K, R047K/N050F/T054L, V190I/D220P/S265W, N112I/T263H/A273H/S285R, T059W/S066N/S129V, T059W/S066Q/S129I, T059W/S129I, T263W/S285P, V190I/D220P, A289V/T263H/A273H, T263H/A273H/S285P, N90S/A273H/S285P, R047K/N050Y/T054L, T004S/S023N, T059R/S129Q, N046Q/R047K/T054H, T059W/S066Q/S129V, E152W/T179P, N050Y/S066Q/S129V, T202S/T263W/A273H, T263W/A273H/S285P, M138L/E152W/T179P, N046Q/R047K, N046Q/T054H/F176L, T004L/G024M, T004S/L282M, T263H/A273H, T263H/A273H/S285W, T004L/S023Y/G024M, L282F/Q286P, T004V/S023Y/G024Y, V190F/S265W, M138L/E152F, V190F/D220E/S265W, N046Q/N050F/T054H, N157Y/S285W, T004F/S023Y/G024M, T004V/S023N/G024M, L198I/D220E/S265Q, N046Q/N050Y/T054K/A154T, S016L/D220E/S265W, D220E/S265W, D220E/A237S/S265W, S066Q/S129Q, V190F/D220E/S265Q/T267I, L282M/F173Y/T219S, E152F/T179P, V190I/S265W, M138L/S066Q, M138L/E152W, T059W/S066Q/A070T/S129I, V190F/D220E/S265N, V190F/S265N, N046Q/N050Y y M138L/E152F/T179P.
 - 60 3. Metaloproteasa neutra aislada variante según la reivindicación 1, donde dicha proteasa comprende múltiples mutaciones seleccionadas entre V190I/D220P, V190I/D220P/S265Q, V190L/D220E, V190I/D220E/S265Q, V190I/D220E/S265W/L282F, V190L/D220E/S265Q, V190I/D220E/S265W, V190L/D220E/S265N, T059R/S066Q/S129I, V190I/D220E/S265N, V190L/D220E/S265W, V190I/D220E, T059W/S066N/S129V,

T059K/S066Q/S129V, T059K/Y082C/S129V, T059R/S066N/S129I, S066Q/S129V, T059R/S066Q/S129V, T059R/S129I, N050Y/T059W/S066N/S129V, D220P/S265N, S066Q/S129I, T059W/S066Q/S129V, T059K/S066Q/S129I, T059R/S129V, N050Y/S066Q/S129V, T059W/S066Q/S129I, N050Y/T059W/S066Q/S129V, T059K/S129I, D220P/S265W, F130L/M138L/T179P, S066N/S129I, T059R/S066N/S129V, F130I/M138L/T179P, T059R/S066Q/N092S/S129I, S066N/S129V, D220E/S265Q, F130L/M138L/E152W/T179P, T059W/S129V, S265P/L282M/Q286R/A289R, S265P/L282F/Q286R/A289R, T059W/S066N/S129I, V190I/D220P/S265W, F130L/E152W/T179P, F130L/M138L/E152F/T179P, Q062K/S066Q/S129I, T059K/S066N/S129I, E152H/T179P, S265P/L282M/Q286K/A289R, F130L/M138L/E152H/T179P, T263W/A273H/S285R, D220E/S265N, F130I/M138L/E152H/T179P, F130V/M138L/E152W/T179P, F130I/M138L/E152W/T179P, T059W/S129I, D220E/S265W, F130V/M138L/T179P, F130L/E152V/T179P, T059R/S129Q, T263W/S285P, F130I/M138L/E152F/T179P, E152W/T179P, V190L/S265Q, F130L/E152F/T179P, L282M/Q286R/A289R/P162S, D220P/S265Q, M138L/E152F/T179P, F130I/E152H/T179P, M138L/E152W/T179P, F130L/T179P, F130L/M138L/E152W/T179P/Q286H, F130L/M138L/E152H, T263W/A273H/S285W, S265P/Q286K, T059W/S066Q/S129Q, T263W/S285R, T059W/S066N/S129Q, T263W/S285W, T059R/S066N/S129Q, S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N, T059W/S129Q, Q062H/S066Q/S129Q, L282M/Q286R/A289R, V190L/D220E/S265N/V291I, V190L/S265N, F130L/M138L/E152W, N050Y/T059R/S129Q, F130I/T179P, T059K/S066Q/S129Q, T059K/S129Q, S265P/L282M/Q286P/A289R, S265P/L282F/Q286P/A289R, T263W/A273H/S285P, S265P/L282M/Q286K, S016L/D220E/S265W, S066Q/S129Q, S265P/L282M/Q286P, L282F/Q286R/A289R, F130V/E152W/T179P, L044Q/T263W/S285R L055F/T059W/S129V, V190L/S265W, Q286R/A289R, G99D/S265P/L282F/Q286K/A289R, F130L/M138L/E152F, T059R/S066Q/S129Q, F130L/E152H, S066N/S129Q, T004S/S023N/G024M/K269N, S265P/L282M, E152F/T179P, T059W/S066N/S129V/S290R, L282F/Q286K/A289R, F130L/M138L, F130I/M138L/E152W, S265P/L282F, F130I/M138L/E152H, F130V/M138L/E152H, V190I/S265Q, M138L/E152M, S265P/L282F/Q286P, M138L/E152H, T059K/S066N/K088E, V190I/S265W, F130L/E152W, L282M/Q286K/A289R, L282M/Q286K/A289R/I253V, T263W/A273H, V190I/S265N, M138L/E152W, A273H/S285R, F130I/M138L, F130L/E152F, F130V/M138L/E152W, T059K/S066Q/V102A/S129Q, F130V/E152H/T179P, F130I/M138L/E152F, F130V/M138L/E152F, M138L/E152F, L282M/Q286R, F130I/E152H, S265P/L282F/A289R/T065S, T263H/A273H/S285R, F130V/M138L, T014M/T059R/S129V, L282M/Q286R/A289R/K11N, A273H/S285P, L282M/Q286K/A289R/S132T, T263H/A273H/S285W, F130V/E152W, S265P/L282F/Q286K/N061Y, F130I/E152W, L198I/D220E/S265Q, V190I/S265L, T263H/S285W, S265P/L282F/A289R, M138L/S066Q, F130I/E152F, N90S/A273H/S285P, S032T/T263H/A273H/S285R, L282F/Q286P/A289R, N157Y/T263W/A273H/S285R, V105A/S129V, T263H/A273H/S285P, S129Q/L282H, T059W/S066Q, F130V/E152H, S023W/G024Y, T004V/S023N, T059R/S066Q, N050W/T054L, L282M/Q286P/A289R, A115V/V190L/S265W, L282M/Q286K, T059R/S066N, L282F/Q286P, T004V/S023W/G024M, S265P/L282F/Q286R/L78H, L282F/Q286K, T004V/S023W/G024Y, S023W/G024M, T059R/R256S, F130V/E152F, T004V/G024W, N050W/T054K, S023Y/G024M, T004V/S023Y, T004V/S023Y/G024M, N050Y/T054H, S023W/G024W, T004V/S023Y/G024Y, T004V/S023N/G024W, F130L/M138L/E152F/T179P/V291I, N050Y/T059K/S066Q, T004V/S023Y/G024W, T059K/S066N, T004V/S023N/G024Y, S023Y/G024W, N050F/T054L, R047K/T054K, S023N/G024W, L282M/A289R, S023Y/G024Y, T004V/G024M, R047K/N050F/T054K, N050F/T054K, T059K/S066Q, S023N/G024M, S023N/G024Y, T004L/S023N, R047K/N050W/T054H, T004L/S023W/G024Y, T004S/S023W, N046Q/N050W/T054H/A142T, T004L/S023Y, T004V/S023W, N050W/T054H, T004S/S023N, T004S/L282M, T004L/S023W, N050F/T054H, N050Y/T054L y R047K/N050W/T054K.

4. Metaloproteasa neutra aislada variante según la reivindicación 1, donde dicha proteasa comprende múltiples mutaciones seleccionadas entre S066Q/S 129V, S066Q/S 129I, N050Y/S066Q/S 129V, S066N/S129I, T059K/S066Q/S129V, S066N/S129V, F130L/E152W/T179P, S265P/L282M/Q286R/A289R, F130L/E152V/T179P, T059K/S066Q/S129I, T263W/S285P, T059K/S066N/S129I, T263W/A273H/S285P, S265P/L282F/Q286R/A289R, F130V/E152W/T179P, T263W/A273H/S285R, V190I/D220P/S265W, F130L/E152H, S066N/S129Q, S265P/L282M/Q286K/A289R, V190I/D220E, T059R/S066N/S129I, V190I/D220E/S265W, T059K/S129I, T059R/S066Q/S129I, F130I/M138L/E152H/T179P, F130I/T179P, T263W/A273H/S285W, S016L/D220E/S265W, S066Q/S129Q, V190I/D220E/S265Q, T059R/S066Q/S129V, D220E/S265N, V190L/D220E, D220E/S265W, V190I/D220P, V190L/D220E/S265N, L044Q/T263W/S285R, S265P/L282M/Q286P/A289R, F130L/M138L/E152H/T179P, T263W/S285R, L282M/Q286R/A289R, T263W/S285W, F130I/E152H/T179P, V190I/D220E/S265N, V190L/D220E/S265W, V190I/D220P/S265Q, T059R/S066N/S129V, V190L/D220E/S265Q, E152H/T179P, F130L/M138L/E152F/T179P, Q062H/S066Q/S129Q, T059R/S129V, V190I/D220E/S265W/L282F, V190I/S265Q, F130L/E152F/T179P, D220E/S265Q, E152W/T179P, T059K/S066Q/S129Q, F130L/M138L/T179P, F130I/M138L/E152F/T179P, F130L/M138L/E152W/T179P, N050Y/T059W/S066Q/S129V, S265P/L282M/Q286K, T059R/S129I, F130V/E152H/T179P, D220P/S265N, S265P/L282M/Q286P, F130I/E152H, T059R/S066Q/N092S/S129I, F130L/T179P, G99D/S265P/L282F/Q286K/A289R, T263W/A273H, V190I/S265N, D220P/S265W, F130L/E152W, F130L/M138L/E152H, S265P/L282M, V190I/S265Q, F130L/E152F, T059K/S129Q, Q286R/A289R, M138L/E152W/T179P, F130I/M138L/E152H, D220P/S265Q, V190L/S265N, F130I/M138L/E152W, S265P/Q286K, V190L/S265Q, V190I/S265W, F130L/M138L/E152F, F130V/E152H,

E152F/T179P, N050Y/T059W/S066N/S129V, T059R/S066N/S129Q, F130I/E152W, F130V/E152W, T059R/S066Q/S129Q, T263H/A273H/S285P, N90S/A273H/S285P, V190L/D220E/S265N/V291I, T059R/S129Q, A273H/S285P, F130I/M138L/E152W/T179P, F130V/M138L/E152F, N050Y/T059R/S129Q, T059W/S066Q/S129I, F130V/M138L/T179P, F130V/M138L/E152W/T179P, V190L/S265W, F130V/M138L/E152W, T059W/S066Q/S129V, V190I/S265Q, F130V/M138L/E152H, F130I/E152F, N157Y/T263W/A273H/S285R, T263H/S285W, M138L/E152F/T179P, A115V/V190L/S265W, M138L/E152M, T263H/A273H/S285W, F130L/M138L/E152W, T059K/S066N/K088E, F130I/M138L/E152F, F130I/M138L/T179P, T004V/S023N, T059K/S066Q/V102A/S129Q, F130L/M138L, N047K/N050F/T054K, T263H/A273H/S285R, F130L/M138L/E152W/T179P/Q286H, M138L/E152H, M138L/S066Q, L282M/Q286R/A289R/P162S, L282F/Q286R/A289R, Q062K/S066Q/S129I, A273H/S285R, S265P/L282F/Q286P, S265P/L282F/Q286P/A289R, S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N, T059W/S066N/S129I, V190I/S265L, T059W/S066N/S129V, F130I/M138L, L282M/Q286K/A289R/I253V, R047K/N050F/T054K, M138L/E152F, N050W/T054K, L198I/D220E/S265Q, L282F/Q286K/A289R, N050F/T054K, L282M/Q286R, M138L/E152W, S265P/L282F, F130V/E152F, T059W/S066N/S129Q, F130V/M138L, T263H/A273H, L282M/Q286K/A289R, N046Q/N050W/T054H/A142T, T059W/S066Q/S129Q, S265P/L282F/A289R/T065S, N050F/T054H, S129Q/L282H, L282M/Q286K/A289R/S 132T, L282M/Q286R/A289R/K11N, T059K/S066N, R047K/N050W/T054K, T059K/S066Q, T004V/S023Y, T059W/S066N/S129V/S290R, N050Y/T059K/S066Q y R047K/N050Y.

5. Polinucleótido que codifica la metaloproteasa neutra según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 5.
7. Célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 6.
8. Método para producir una enzima que presenta actividad de metaloproteasa neutra, que comprende el cultivo de la célula hospedadora según la reivindicación 7 en condiciones adecuadas para la producción de dicha variante de metaloproteasa neutra.
9. Método según la reivindicación 8, que comprende además la etapa de recolectar dicha variante de metaloproteasa neutra producida.
10. Método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde dicha célula hospedadora es una especie *Bacillus*.
11. Composición limpiadora que comprende la variante de metaloproteasa neutra según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
12. Método de limpieza, que comprende la etapa de poner en contacto una superficie y/o un artículo que comprende una tela con la composición limpiadora según la reivindicación 11.
13. Método según la reivindicación 12, donde dicha superficie y/o artículo que comprende una tela comprende una mancha de hierba y dicha etapa de poner en contacto comprende la puesta en contacto de dicha mancha de hierba con dicha composición limpiadora.
14. Composición de pienso, composición de elaboración de tejidos o composición de tratamiento del cuero que comprende la variante de metaloproteasa neutra aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

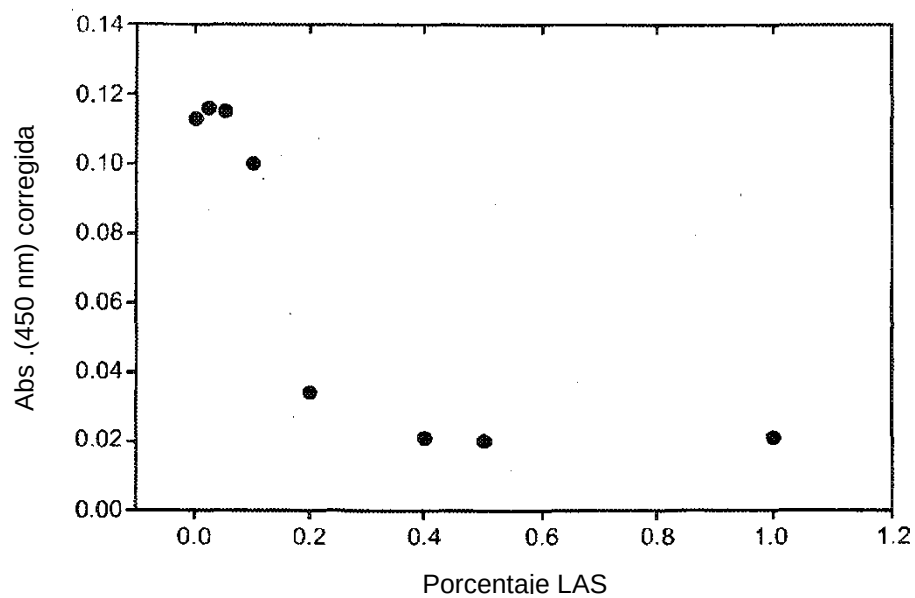


FIG. 1

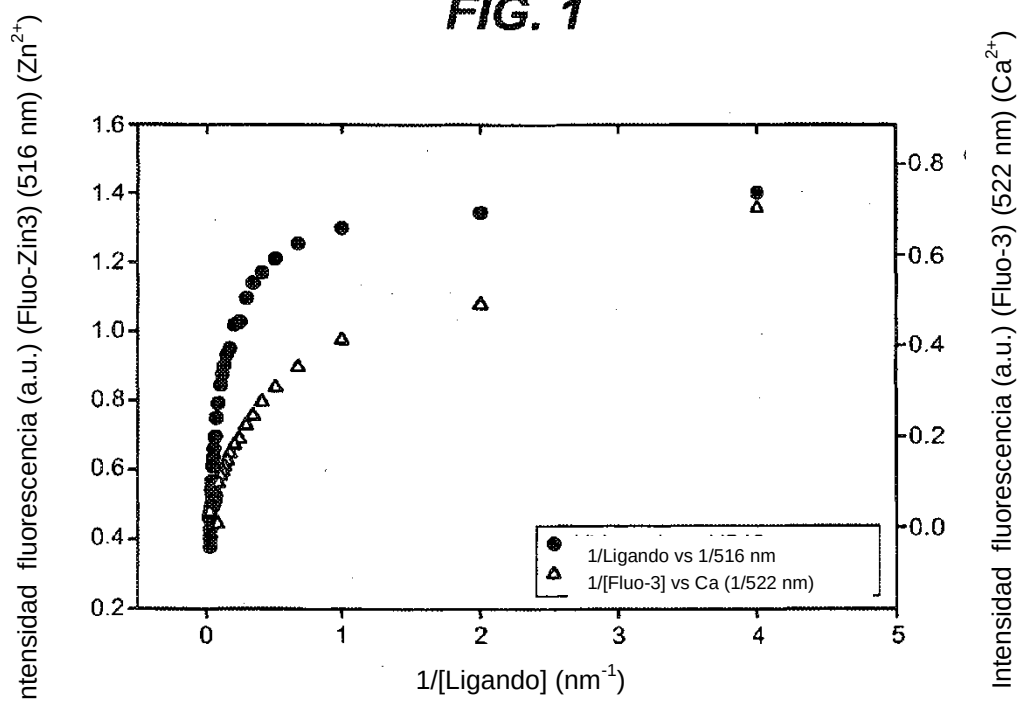


FIG. 2

```

B.amylo_nprE -----MGIGKKLSVAVAASFMSLTISLPGVQAAENPQKENLTNFVPKHSLVQSEL
B.sub_nprE -----MGLGKKLSVRVAASFMSLSISLPGVQAAEGHQLKENQTNFLSKKPIAQSEL
S.aur_aur -----MRKFSRYAFTSMATVTLSSLTFAALASDTNHKPATSDINFEI
B.ste_nprT -----MNKRAMLGAIGLAFGLMAWPFASAKGSMVWNEQWKTPSFVSGSLNGGEQAL
B.cal_npr -----MNKRAMLGAIGLAFGLMAWPFASAKGSMVWNEQWKTPSFVSGSLNG---RCS
B.thu_nprB MKKKSLALVLATGMVTTFGGTGSADFADSKNVLSTKKYNETVQSPEFVSGDLTEATGKKA
B.cer_nprC MKKKSLALVLATGMVTTFGGTGSADFADSKNVLSTKKYNETVQSPEFISGDLTEATGKKA
B.sub_nprB --MRNLTKTSLLLAGLCTAAQMVFTVTHASAEESI EYDHTYQTFPSYIIEKSPQKPVQNTTQ
B.cerE33L_npr --MKNKKNFVKIGLITGVMLSVIMPYGDYAATEDLKVETKEDTFRGTGNTLVFSPQKSAEN

B.amylo_nprE PSVSDKAIKQYLKQNGKVFKGNPSERLKLIDQTTDDLGYKHFRYVPVWNGVPVKDSQVIT
B.sub_nprE SAPNDKAVKQFLKNSNIFKGDPSKSVKLVESTTDALGYKHFRYAFVWNGVFIKDSQVIV
S.aur_aur TQKSD-AVKALKELPKSENKVNHYQDYSVTDVKTDKKGFTHTLQPSVDGVHAPDKEVKV
B.ste_nprT EELVYQYVDRENGTFRLLGGARDRRLALI--GKQTDDELGHTVMRFEQRHHGIPVYGTMLAA
B.cal_npr QELVYRYLDQEKNTFQLGGQARERLSLI--GNKLDDELGHTVMRFEQAIAASLCMGAVLVA
B.thu_nprB ESVVFDYLNAAKGDYKLGEKSAQDCFPVKQAKKDAVTDSTVLRLLQOVYEGVPVWGSTQVA
B.cer_nprC ESVVFDYLNAAKGDYKLGEKSAQDCFPVKQAKKDAVTDSTVVRMQOVYEGVPVWGSTQVA
B.sub_nprB KESLFSYLDKHQTQFKLKGNAHSHFRVSK-TIKDPKTKQTFKLTVEYKGIPIYGFQAV
B.cerE33L_npr VAKDALKGKTEQALSSKQVNTSEKVNYNVTQSRKSYDGTTLVRLQQTTEGRDVGYYQLTA

B.amylo_nprE HVDKSNNVYAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQALDHAYKAIGKSP EAVSNGTVANKNKA
B.sub_nprE HVDKSDNVYAVNGELHNQSAAKTDNSQKVSSEKALALAFKALGKSPDAVSNGAANKNKA
S.aur_aur EADKSGKVVLLING----DTDAKKVKPTNKVTL SKDEAADKAFNAVKIDKNKAKNLQDDVI
B.ste_nprT HV-KDGELIALSGSLIPNL DQGPRLKAKTPTVTVQQA EAJAEQDVTETVTKERPTTNGER
B.cal_npr HV-NDGELSSLSGTLIPNL D-KRTLKTEAAISIQQAEMIAKQDVADRVTKERPAAEEGKP
B.thu_nprB HVSKDGSILKVLSGTVAPDL DKKKELKNKNKIEGAKAIEIAQKDLGIT----PKYEVEPK
B.cer_nprC HVSKDGSILKVLSGTVAPDL DKKKELKNKNKIEGAKAIEIAQKDLGIT----PKYEVEPK
B.sub_nprB AMKENKQVKSEFGKVPQIKDVSVTPSISEKKAHTARRELEASIGKI----EYLDGEPK
B.cerE33L_npr HINDDGVLTSVSGDSAQDLQOQEDLKQITLSEEDAKKQLFKTYGDNLT---FVEEPEIK
.. : . * :

B.amylo_nprE ELKAAATKDGKYRLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVDAETGKIILKQNKVE-----
B.sub_nprE ELKAIETKDGSYRLAYDVTIRYVEPEPANWEVLVDAETGSIILKQNKVE-----
S.aur_aur KENKVEIDGDSNKYIYNIELITVTPEISHWKVKIDADTGAVVEKTNIVK-----
B.ste_nprT TRLVITYPTDGTARLAYEVNVRFLTPVPGNWWYIIDATDGA ILNKFNQID-----
B.cal_npr TRLVITYPDEETPRLAYEVNVRFLTPVPGNWIYIMDAADGKVLNKNQMD-----
B.thu_nprB ADLYVYQNGEETTYAYVVNLNFLDPSPGNYFFIEADSGKVLNKNKLDHVNEDKSPVK
B.cer_nprC ADLYVYQNGEETTYAYVVNLNFLDPSPGNYFFIEADSGKVLNKNKENTIDHVTNDDKSPVK
B.sub_nprB GELYIYPHDGEYDLAYLVRLSTSEPEPGYWHYFIDAKNGKVIESFNAIH-----
B.cerE33L_npr QVVYVDENTNKATSAYQITFSASTPEYVSGTVLIDAFVGBLLKELVQKLG IQVDSSI---
* : . * : * * : :

B.amylo_nprE -----HAATGTGTTLKGTVSLNISSESGKYVLRDL SKPTGTQIITYD
B.sub_nprE -----HAATGSGTTLKGATVPLNISYEGGKYVLRDL SKPTGTQIITYD
S.aur_aur -----EAAATGTGKGVLDGTDKININSIDGGFSLDLTHQ GKLSAYNFN
B.ste_nprT -----SRQPGGGQPVAGASTVGVGRGVLDQKYINTTYSY YGYLLQDNTRGSGIFTYD
B.cal_npr -----EAKPGGAQPVAGTSTVGVGRGVLDQKYINTTYSY YGYLLQDNTRGSGIFTYD
B.thu_nprB QEAPKQEVKPAVKPVGTNAVGTGKGVLDGTDKSLNTLSS--SSYLLQDNTRGATIFTYD
B.cer_nprC QEAPKQDAKAVVKPVGTGNKVGTGKGVLDGTDKSLNTLSC--SSYLLQDNTRGATIFTYD
B.sub_nprB -----EAAAGTGIGVSGDEKSFVTEQN--GRFYLADETRGKGINTFD
B.cerE33L_npr -----VQSATSNKSDPSKLTGTGKDDLGMNRTFGISQRS-DGTYTLADYSRKGKIETYT
* * * : : :

```

FIG. 3A

B.amylo_nprE LQNREY-----NLPGTLVSSSTTKQFTTSSQRAAVDAHYNLCVKVDYFYQKFNRSNYDN
B.sub_nprE LQNRQS-----RLPGLTVSSTTKFTTSSSQRAAVDAHYNLCVKVDYFYSNFKNRSYDN
S.aur_aur DQTGQ-----ATLITNEDENFVKDDQRAGVDANYAKQTYDYKYNTFGRESYDN
B.ste_nprT GGNR-----TVLPGLSWTDGDGNQFFASDAAAVDAHYYAGVVYDYKYNVHGRLSYDG
B.cal_npr GRNR-----TVLPGLSWADGDGNQFFASYDAAAVDAHYYAGVVYDYKYNVHGRLSYDG
B.thu_nprB AKNR-----TTLPGLTWADNDVFNAAYDAAAVDAHYYAGKTYDYKYATFNRSIND
B.cer_nprC AKNR-----STLPGTLWADADNVFAAYDAAAVDAHYYAGKTYDYKYATFNRSIND
B.sub_nprB AKNLNETLTFTLLSQLIGYTGEIVSGTSVFNEPAADAHANAQAVIDYYSKTFGRRSFDQ
B.cerE33L_npr ANYKDYNMYR--RNIIWGILDDLVTNSNSTNETDPKAUSAHLATKVYDFYQEKYSRNSFDN
. . . : * . * : . * . * :

B.amylo_nprE KGGKIVSVSVHYG-----SRYNNAAWIGDQMITYGDCGDSFFSPLSGSMDVTAHEMT
B.sub_nprE KGSKIVSVSVHYG-----TQYNNAAWTGDMITYGDCGDSFFSPISSSLDVTAHEMT
S.aur_aur HGSPIVSLTHVNHYGGQ----DNRNNAAWIGDKMITYGDCGDRFTTNLSGANDVVAHELT
B.ste_nprT SNAAIRSTVHYG-----RCYNNAFWNGSQMVYGDGCGDTFLPFSSGIDVVGHELT
B.cal_npr SNAAIRSTVHYG-----KGYNNAFWNGSQMVYGDGCGDTFLPFSSGIDVVGHELT
B.thu_nprB AGAPLKSTVHYG-----SKYNNAFWNGSQMVYGDGCGDTFTLSGGIDVIGHILT
B.cer_nprC AGAPLKSTVHYG-----SNYNNAFWNGSQMVYGDGCGDTFTLSGGIDVIGHILT
B.sub_nprB NGARISTVHYG-----KQYNNAFWNGSQMVYGDGCGSKFKPLSSLDIVAHEIT
B.cerE33L_npr NGQKVISVHVHGWNTNGTNKGNPKQWFNAFSNGAMLVYGD-----PIVAFDVAHGHEFT
. . . * . * . ** * . * : * * : . . . * . * . * :

B.amylo_nprE HGVTOETANLIYENQPALNESFSDFVGYFND-----TEDWDIGEDITVSQPALRSLSNP
B.sub_nprE HGVTOETANLIYENQPALNESFSDFVGYFND-----TEDWDIGEDITVSQPALRSLSNP
S.aur_aur HGVTOETANLEYKQSGALNESFSDFVGYFVD-----DEDFLMGEDVYTPGKEGDALRSM
B.ste_nprT HAVTDYTAGLVYQNESGALNEAMSDFGTFLVEFYANRPDWEIGEDIYTPGVAGDALRSM
B.cal_npr HAVTDYTAGLVYQNESGAINEAMSDFGTFLVEFYANRPDWEIGEDIYTPGVAGDALRSM
B.thu_nprB HAVTEYSSDLIYQNESGALNEAISDFGTFLVEFYDNRNPDWEIGEDIYTPGKAGDALRSM
B.cer_nprC HAVTENSSMLIYQNESGALNEAISDFGTFLVEFYDNRNPDWEIGEDIYTPGKAGDALRSM
B.sub_nprB HAVTQYSAGLLYQCEFGALNESISDIIMGAMAD----RDDWEIGEDVYTPGIAGDSLRLS
B.cerE33L_npr HAVTRNESSGLEAYAGEAGALNEAISDIIGVAKEYKANNGKFNTWMGEQSGRIFRDMKNPSS
* . * . : * . * . : * . * . : * . * . :

B.amylo_nprE TKYGQPDNFKNYKNLFNTDAGDYGGVHTNSGIPNKAAYN-----TITKLGVNKAIE
B.sub_nprE TKYNQPDNYANYRNLPNTDEGDYGGVHTNSGIPNKAAYN-----TITKLGVSKSQ
S.aur_aur SNPEQFGQPSHMKDYYVTEK-DNGGVHTNSGIPNKAAYN-----VIAIQISKSE
B.ste_nprT SDPAKYGDPPDHYSKRYTGTO-DNGGVHTNSGINKAAYLLSQGGVHYGVCSVTGIGRKMG
B.cal_npr SDPAKYGDPPDHYSKRYTGTO-DNGGVHTNSGINKAAYLLSQGGVHYGVCSVTGIGRKMG
B.thu_nprB SDPTKYGDPPDHYSKRYTGTS-DNGGVHTNSGINKQAYLLANGTHYGVTVTIGIKDKLG
B.cer_nprC SDPTKYGDPPDHYSNRYTGTE-DYGGVHINSIHINKAAYLLAEGGVHHGVQVEGIGREASE
B.sub_nprB EDPSKQGPNPDHYSNRYTGTE-DYGGVHINSIHINKAAYLLAEGGVHHGVQVEGIGREASE
B.cerE33L_npr ISSRYPEDYRHYNLPLDAADHDGGVHTNSSIINKVAYLIAACGNHNHGNVNVQIGEDKMF
. . . : * . * . : * . * . : * . * . :

B.amylo_nprE QIYYRALTVYLTPSSSTFKDAAKALIQSARDLYG--SQDAASVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:173)
B.sub_nprE QIYYRALTTYLTTPSSSTFKDAAKALIQSARDLYG--STDAAKVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:174)
S.aur_aur QIYYRALTEYLTSNSNFKCKDCDALYQAAKDLYD-EQTAEQVYEAWNVEGVGE (SEQ ID NO:175)
B.ste_nprT KIFYRALVYVLTPTSNSFQLRAACVQAAAADLYGSTSQEVNSVKQAFNAVGVY (SEQ ID NO:176)
B.cal_npr KIFYRALVYVLTPTSNSFQLRAACVQAAAADLYGSTSQEVNSVKQAFNAVGVY (SEQ ID NO:177)
B.thu_nprB AIYYRANTQYFTQSTTFPSQARAGAVQAAAADLYGCANSAEVNAVKSQSFSAVGIN (SEQ ID NO:178)
B.cer_nprC AIYYRANTQYFTQSTTFPSQARAGAVQAAAADLYGCANSAEVNAVKSQSFSAVGIN (SEQ ID NO:179)
B.sub_nprB QIYYRALTYVVTASTDFSMMKQAAIEAADLYGECGSKQASVEKAYEAUGIL (SEQ ID NO:180)
B.cerE33L_npr DIFYANTBELNMITSDFKELKEACIRVATNLVYKSDSSEVOAQVQAFKAAIY- (SEQ ID NO:181)
* . * . : * . * . : * . * . : * . * . :

FIG. 3B

```

Termolisina
B. stearrowthermophilus  ITGTSTVGVGRGVLGDQKNINTTSTYYY---YLQDNTR--NGGIETYDAK
B. caldexticus            ITGTSTVGVGRGVLGDQKNINTTSTYYY---YLQDNTR--NGGIETYDAK
B. cereus                 VAGTSTVGVGRGVLGDQKYINTTSSGYGYLQDNTR--GSGIETYDGR
B. brevis                 VTCTNKVGTGKGVLGDTKSLNTTSLGSS---YYLQDNTR--GATIFTYDAK
B. polymyxa               VTAT-----GKGVLGDTKQFETTKQGST---YMLKDTTR--GKGIETPTAN
B. pumilus                ----ATGKVLGDSKSFETTASGSS---YQLKDTTR--NGGIVPYTAS
B. subtilis var.          ---AAATGSGTTLKGATVPLNISYEGGK---YVLRDLSKPTGTQIITYDLQ
B. subtilis               ---AAATGSGTTLKGATVPLNISYEGGK---YVLRDLSKPTGTQIITYDLQ
B. amyloliquefaciens      ---AATTGTGTTLKGKTVSENLISSESGK---YVLRDLSKPTGTQIITYDLQ

```

94

Termolisina	YRTT-LPGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYAGVTYDYKVNHNRLSYD
<i>E. stearothermophilus</i>	YRTT-LPGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYAGVTYDYKVNHNRLSYD
<i>E. caldocyticus</i>	NRTV-LPGSLWADGDGNQFFASYDAAAVDAHYAGVVYDYKVNHGRLSYD
<i>E. cereus</i>	NRST-LPGTLWADADNVENAAYDAAAVDAHYAGKTYDYKATFNRRNSIN
<i>E. brevis</i>	NRTS-LPGTLMTDSDDNYWT---DGAAVDAHAHAQKTYDYKFNVNHNRLSYD
<i>E. polymyxa</i>	NRQS-IPGTLTLDADNVN---DPAGVDAHAYAAKTYDYKSKFGRNSID
<i>E. pumilus</i>	NRQSRLLPGTLVSSSTTKFTSSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYFSNFKRNSYD
<i>E. subtilis</i> var.	NRQSRLLPGTLVSSSTTKFTSSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYFSNFKRNSYD
<i>E. subtilis</i>	-----AVDAHYNLGKVYDYFYFSNFKRNSYD
<i>E. amylioliquefaciens</i>	NREYNLPGTLVSSSTTNQFTTSSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRRNSYD

**** * * *

142

Termolisina	GNNAAIRSVVHYSQGYNNAFWNGSQMVYGDGDG--QTFTPLSGGIDVVAH
<i>B. stearoothermophilus</i>	GNNAAIRSSVVEHYSQGYNNAFWNGSQMVYGDGDG--QTFTPLSGGIDVVAH
<i>B. caldoyticus</i>	GSNAAIRSTVHYSGRYNNAFWNGSQMVYGDGDG--QTFLFPLSGGIDVVGH
<i>B. cereus</i>	DAGAPLKSTVEYGENYNNAFWNGSQMVYGDGDG--VTFTSLSGGIDVIGH
<i>B. brevis</i>	GNNAVIRSTVHYSTRYNNAFWNGSQMVYGDGDG--TFTPLSGGIDVVAH
<i>B. polymyxa</i>	GRGLQLRSTVHYGSRYNNAFWNGSQMTYGDGDGSGSTFIAPSGGDFDVGH
<i>B. pumilus</i>	NKGSKIVSSVHYGTQYNNAAWTGDQMIYGDGDG--SFFSPLSGSLDVTAH
<i>B. subtilis</i> var.	NKGSKIVSSVHYGTQYNNAAWTGDQMIYGDGDG--SFFSPLSGSLDVTAH
<i>B. subtilis</i>	NKGSKIVSSVHYGTQYNNAAWTGDQMIYGDGDG--SFFSPLSGSLDVTAH
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NKGGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDG--SFFSPLSGSMDDVTAH
	* : *

Termolisina 192

B. stearoothermophilus ELTHAVTDYTAGLIYQNESGAINEAISDIFGTLVKFYANKNPDWEIGEDV
B. caldoyticus ELTHAVTDYTAGLIYQNESGAINEAISDIFGTLVEFYANKNPDWEIGEDV
B. cereus ELTHAVTDYTAGLIYQNESGAINEAISDIFGTLVEFYANKNPDWEIGEDI
B. brevis ELTHAVTENSNNLIYQNESGALNEAISDIFGTLVEFYCNRNPDWEIGEDI
B. polymyxa ELTHAVTERTAGLVYQNESGALNESMSDIFGAMVD-----NDDWLMGEDI
B. pumilus ELTHGVTETYNLEYYGESGALNEAFSDVIGNDIQ-----RKNLWVGDDI
B. subtilis EMTHGVTQETANLIYENQPGALNESFSDFVEGYND-----TEDWDIGEDI
B. subtilis var. EMTHGVTQETANLIYENQPGALNESFSDFVEGYFND-----TEDWDIGEDI
B. subtilis EMTHGVTQETANLIYENQPGALNESFSDFVEGYFND-----TEDWDIGEDI
B. amyloliquefaciens EMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDFVEGYFND-----TEDWDIGEDI
* * * * *

Termolisina 238

E. stearrowthermophilus YTPGISGDSLRSMSDPFAKYGDPPDHYSKR----YTGTQDNGGVHINSIGIIN
E. caldoyticus YTPGISGDSLRSMSDPFAKYGDPPDHYSKR----YTGTQDNGGVHINSIGIIN
E. cereus YTPGVAGDALRSMSDPFAKYGDPPDHYSKR----YTGTQDNGGVHINSIGIIN
E. brevis YTPGKAGDALRSMSDPFKYGDPPDHYSKR----YTGSNDNGGVHINSIGIIN
E. polymyxa YTPGRSGDALRSLQDPAAYGDPPDHYSKR----YTGSNDNGGVHINSIGIIN
E. pumilus YTPNICGDALRSMSNPNTLYDQPHYSNL----YKGSNDNGGVHINSIGIIN
E. subtilis var. T---VSQPALRSLSNPTKYNQPNYANYRNLPNTDEGDYGGVHINSIGIPN
E. subtilis T---VSQPALRSLSNPTKYNQPNYANYRNLPNTDEGDYGGVHINSIGIPN
E. amylioliquefaciens T---VSQPALRSLSNPTKYQPDNFKYKNLPNTDAGDYGGVHINSIGIPN

FIG. 4A

288

Termolisina KAAYLISQGGTHYGVSVVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAA

B. stearothermophilus KAAYLISQGGTHYGVSVVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAA

B. caldoyticus KAAYLLSQGGVHYGVSVTGIGRDKMGKIFYRALVYYLTPTS NFSQLRAAC

B. cereus KQAYLLANGGTHYGVTVTGIGKDKLGAIYYRANTQYFTQSTTFQSARAGA

B. brevis KAAYLLAEGGTHYGVVRVNGIGRTDTAKIYYHALTHYLTPYSNFSAMRRAA

B. polymyxa KAYYLLAQGGTFHGVTVNGIGRDAAVQIYYSFTNYLTSSSDFSNARAAV

B. pumilus KAAYN-----TITKLGVSQSQQIYYRALTTYLTPTSSTFKDAKAAL

B. subtilis var. KAAYN-----TITKLGVSQSQQIYYRALTTYLTPTSSTFKDAKAAL

B. subtilis KAAYN-----TITKLGVSQSQQIYYRALTTYLTPTSSTFKDAKAAL

B. amyloliquefaciens KAAYN-----TITKIGVNKAQIYYRALTVYLTPTSSTFKDAKAAL

* * : * * * * : *

316

Termolisina VQSATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK (SEQ ID NO:182)

B. stearothermophilus VQSATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK (SEQ ID NO:183)

B. caldoyticus VQAAADLYGSTSQEVNSVKQAFNAVGVY (SEQ ID NO:184)

B. cereus VQAAADLYGANSAEVAAVKQSFSAVGVN (SEQ ID NO:185)

B. brevis VLSATDLFGANSRQVQAVNAAYDAVGVK (SEQ ID NO:186)

B. polymyxa IQAAKDLYGANSAEATAAAKSFDAVG- (SEQ ID NO:187)

B. pumilus IQSARDLYGST--DAAKVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:188)

B. subtilis var. IQSARDLYGST--DAAKVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:189)

B. subtilis IQSARDLYGST--DAAKVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:190)

B. amyloliquefaciens IQSARDLYGSQ--DAASVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:191)

: * * * : : : : : * * *

FIG. 4B

NprE ---AATTGTGTTLK--GKTVSLNISSESGKYVLRDLKSKFTGTQIITYDLQNREYNLPGT-

1BQB.A ---AAATGTGKGVL--GDTKDININSDGCFSLDLT--HQGKLSAYNFENDQTGQ--AT-

1EZM ---AEAGGPGGNQKIGKYTYGSDYGLPLIVNDRCEMD---DGNVITVDMNSSTDSSKTTT

1NPC VTGTNKVGTGKGVL--GDTKS--LNTTLSGSSYYLQDNTRGATIFTYDAKNRS--TLPGT-

NprE LVSSTTNQFTTSS---QRAAVDAHYNLKGKVDYFYQKENRNSYDNKGGKIVSSVHYGS--

1BQB.A LITNEDENFVKDD---QRAGVDANYAKQTYDYYKNTFGRESYDNHGSPIVSLTHVNHYC

1EZM FRFACPTNTYKQVNGAYSPLINDAHF--FGGVVFKLYRDWFGTSPLT--HKIYMKVHYGR--

1NPC LWADADNVFNAAY---DAAAVDAHYYAGKTYDYYKATFNRSINDAGAPLKSTVHYGS-

NprE ---RYNNAAWIGDQMIYGDGDSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALN

1BQB.A GQDNRRNAAWIGDKMIYGDGDRFTNLSCANDVVAHEITHGVTQQTANLEYKDQSGALN

1EZM ---SVENAYWDGTAMLFCDGAT--MFYPLV--SLDVAAHEVSHGFTEQNSGLIYRGQSGGMN

1NPC ---NYNNAFWNGSQMVYGDGDEVTFSTLSGGIDVIGHELTHAVTENSNNLIYQNESGALN

NprE ESFSDFVFCYFND----TEDWDIGEDITVS---QPALRSLSNPTKYC--QPDNFKNYKNLP

1BQB.A ESFSDFVFCYFVD----DEDFLMGEDVYTPGKEGDALRSMSNPEQFG--QPSHMKDYVY--

1EZM EAFSDMAGEAAEFYMRGKNDFLIGYDIKKG---SGALRYMDQPSRDGRSIDNASQYYNG-

1NPC EATSDIFGTLVEFYDNRNPDWEIGEDIYTPGKAGDALRSMSDPTKYG--DPDHYSKRYTGS

NprE NTDAGBYGCVHTNSGIPNKAAYNTIT-----KICVN--KAEQIYYRALTVYLTPTS

1BQB.A --TEKDNGGVHTNSGIPNKAAYNVIQ-----AIGKS--KSEQIYYRALTEYLTSEN

1EZM -----IDVHSSGVYNRAFYLLAN-----SPGWDRKAFEVFVDANRYWYAT

1NPC ----SDNGGVHTNSGIINKQAYLLANGGTHYGVTVTGIGKD--KLGAIYYRANTQYFTQS

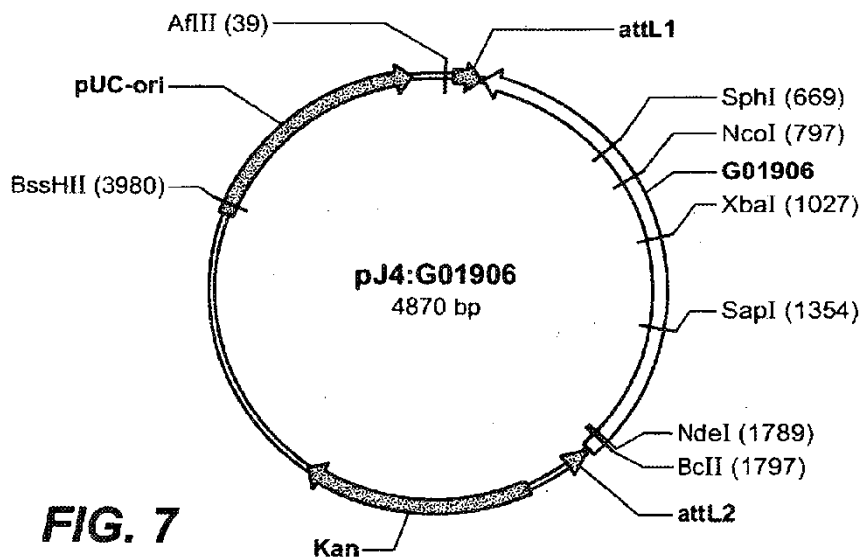
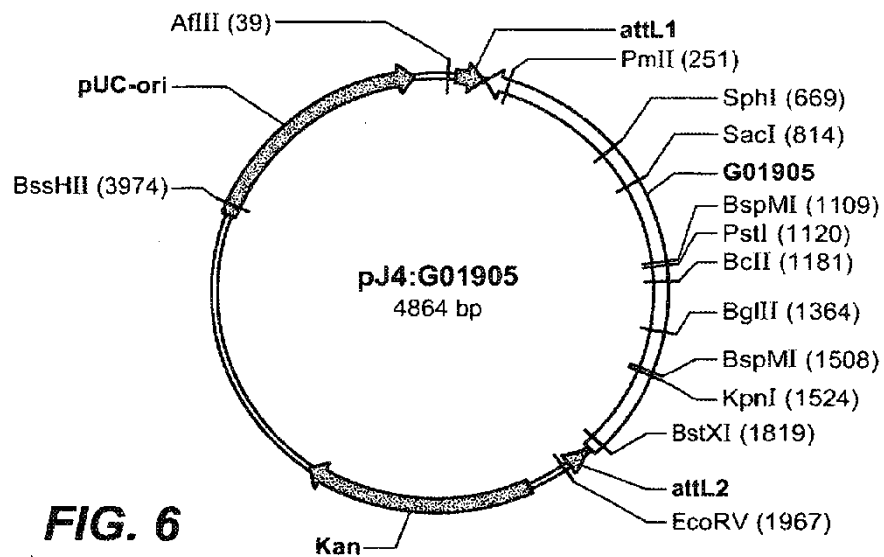
NprE STFKDAKAALIQSARDLYG--SQDAASVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:192)

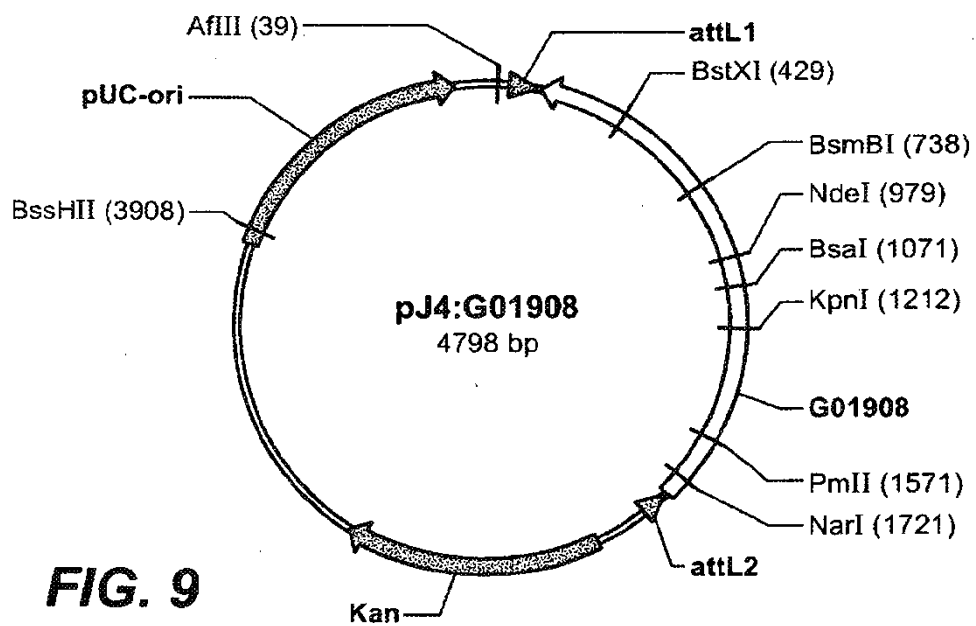
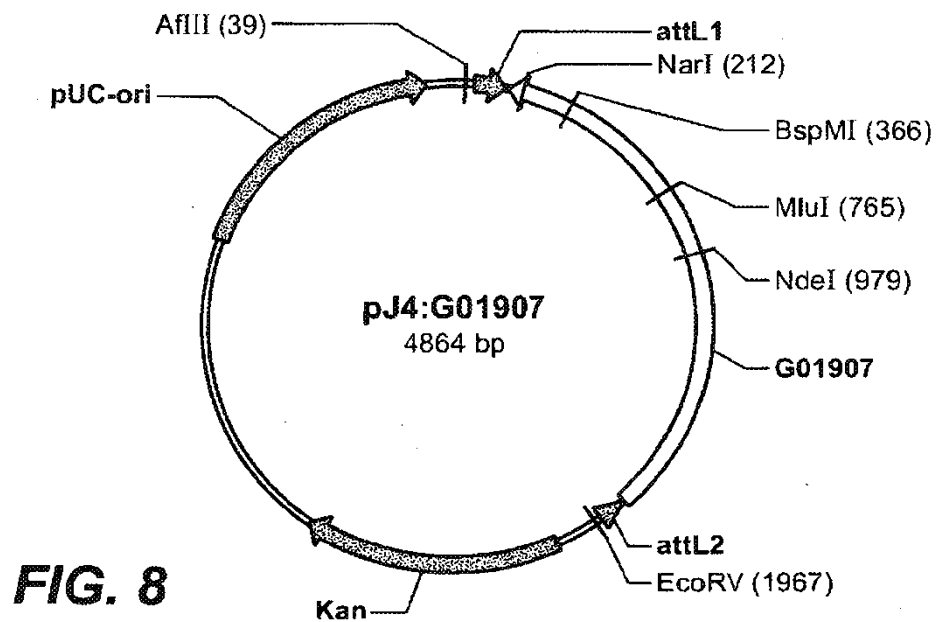
1BQB.A SNFKDLKDALYQAAKDLYE--QQTAEQVYEAWNEVGVE (SEQ ID NO:193)

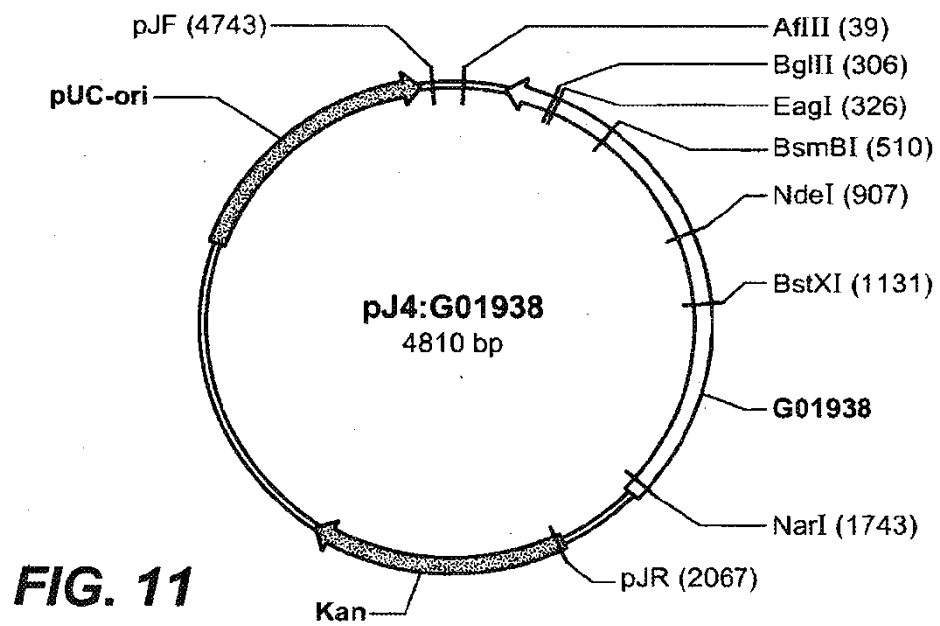
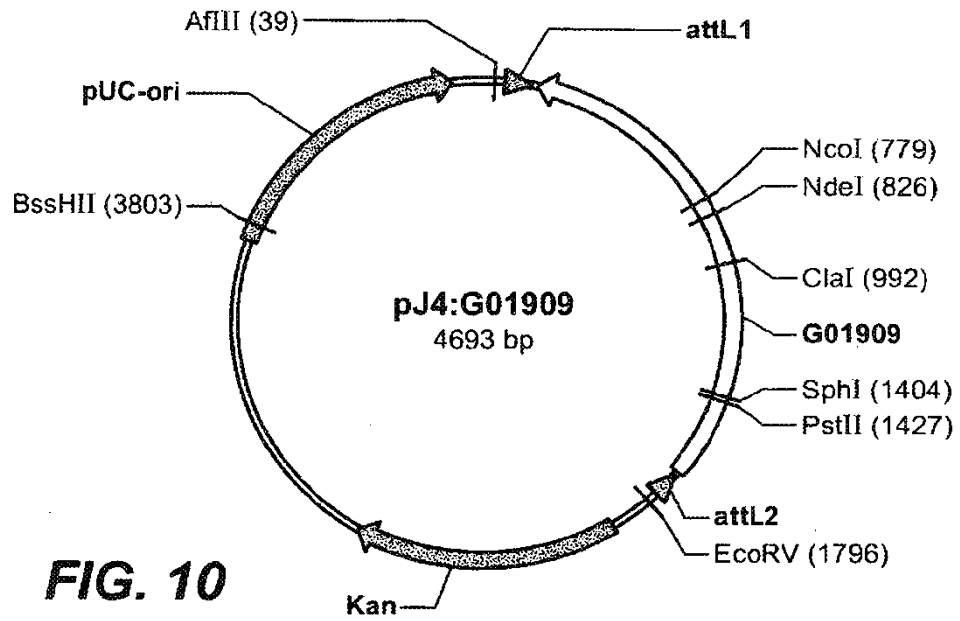
1EZM SNYNSGACGVIRSAQNRNY--SAADVTRAFTVGVTCF (SEQ ID NO:194)

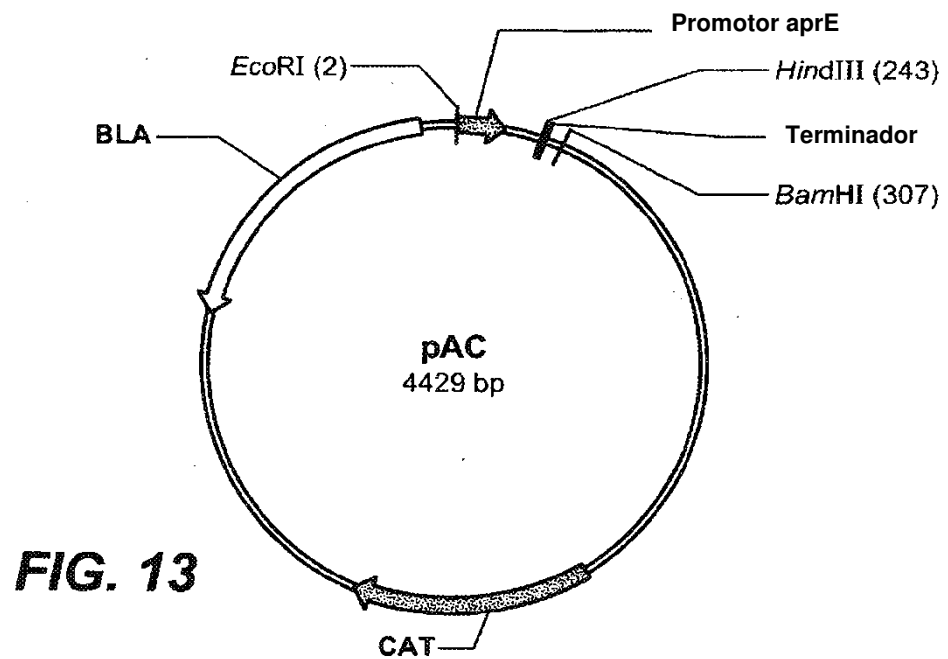
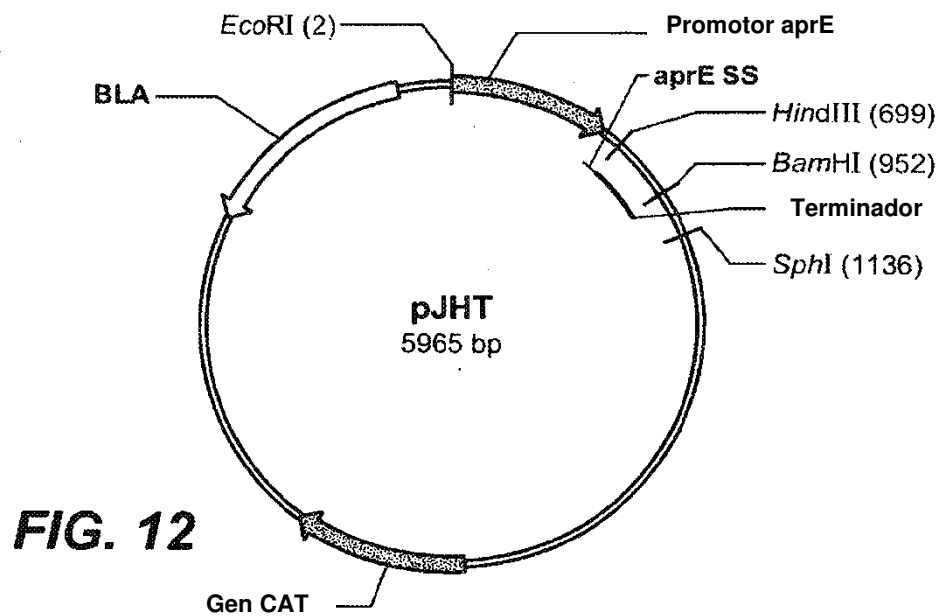
1NPC TTFSQARAGAVQAAADLYGANSAEVAAVKQSFSAVGVN (SEQ ID NO:195)

FIG. 5









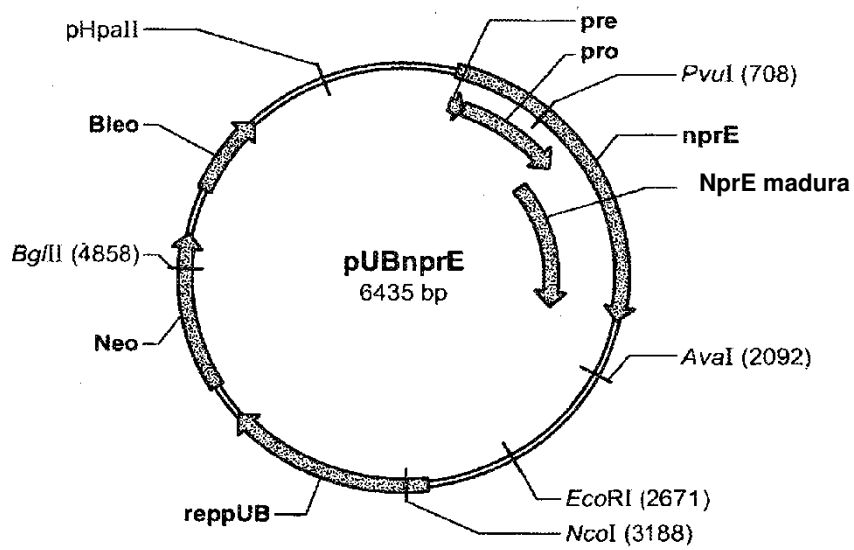


FIG. 14

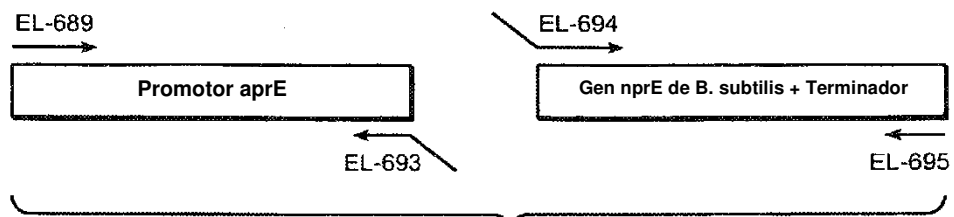


FIG. 15

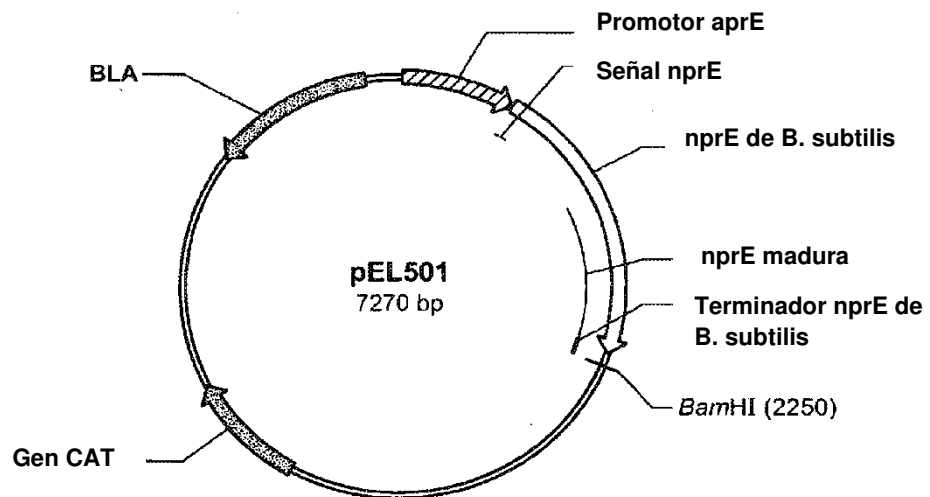


FIG. 16

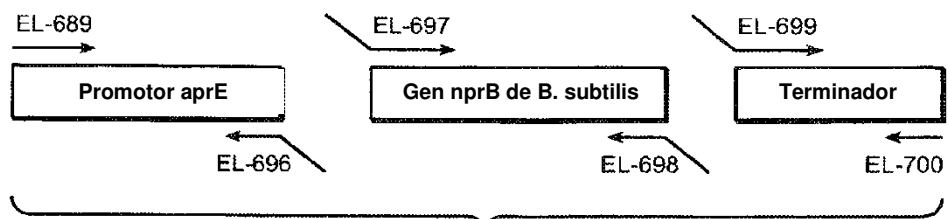


FIG. 17

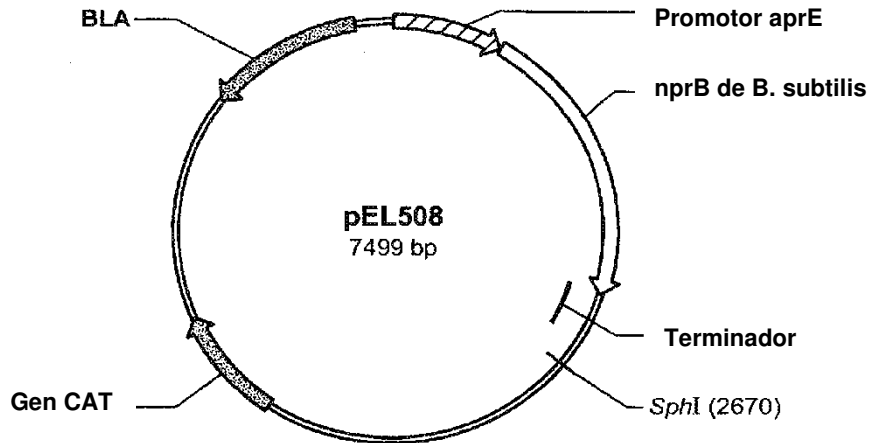


FIG. 18

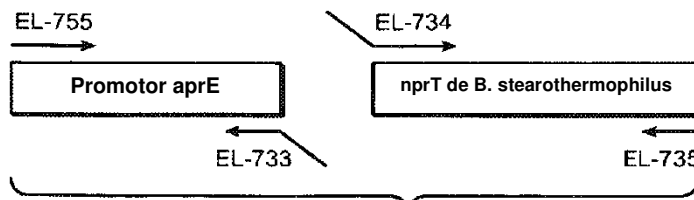


FIG. 19

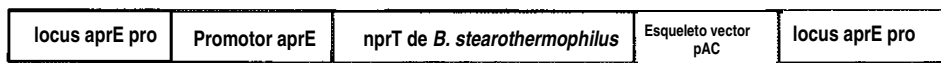


FIG. 20

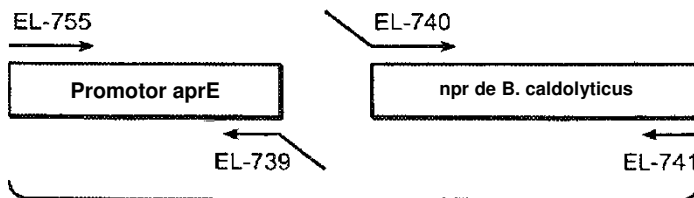


FIG. 21

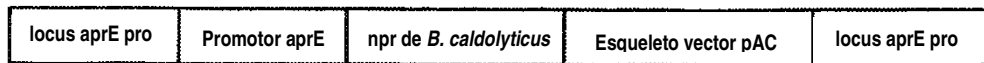


FIG. 22

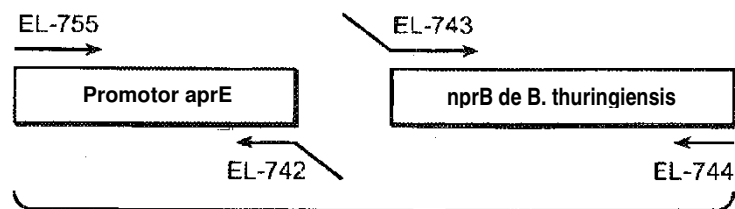


FIG. 23

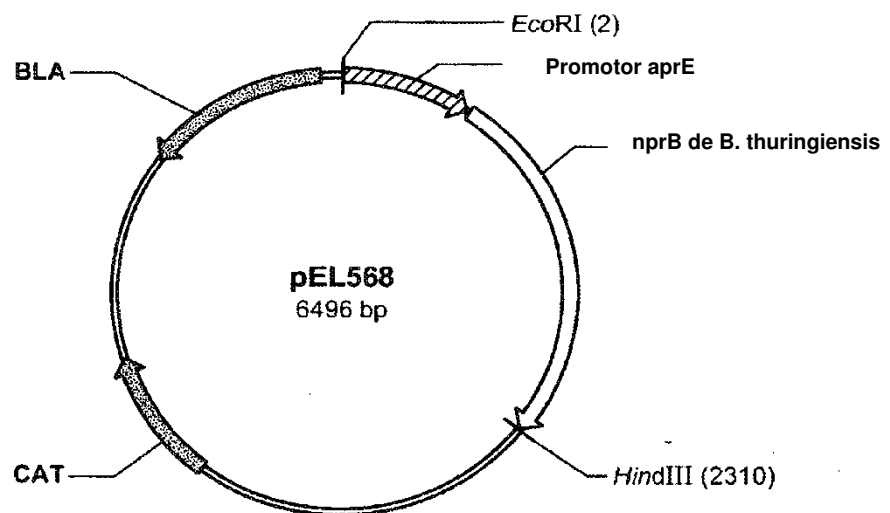


FIG. 24

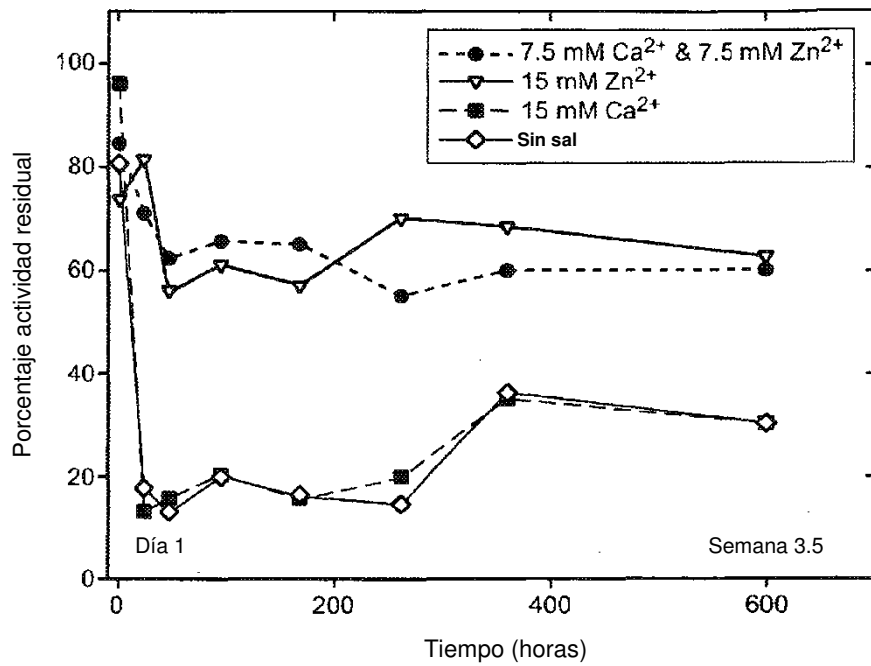


FIG. 25

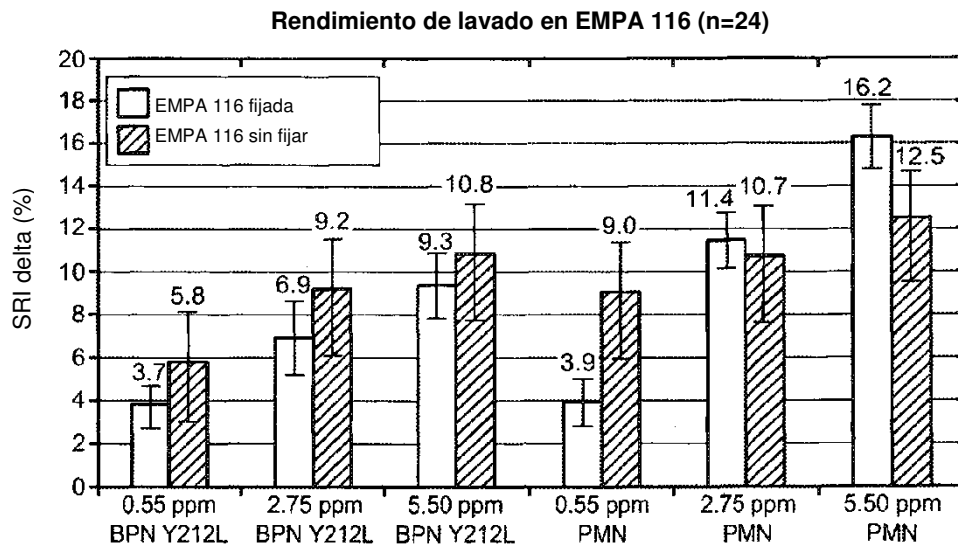


FIG. 26A

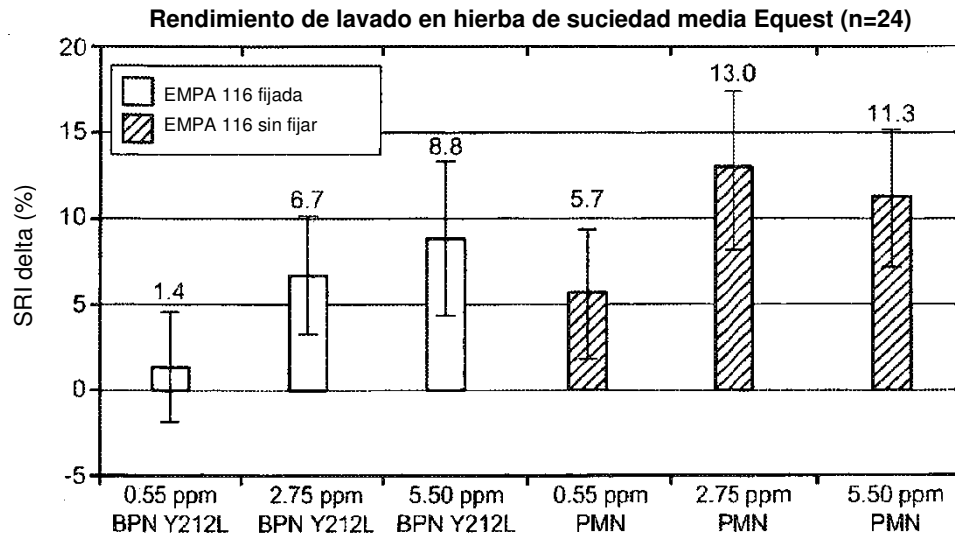


FIG. 26B

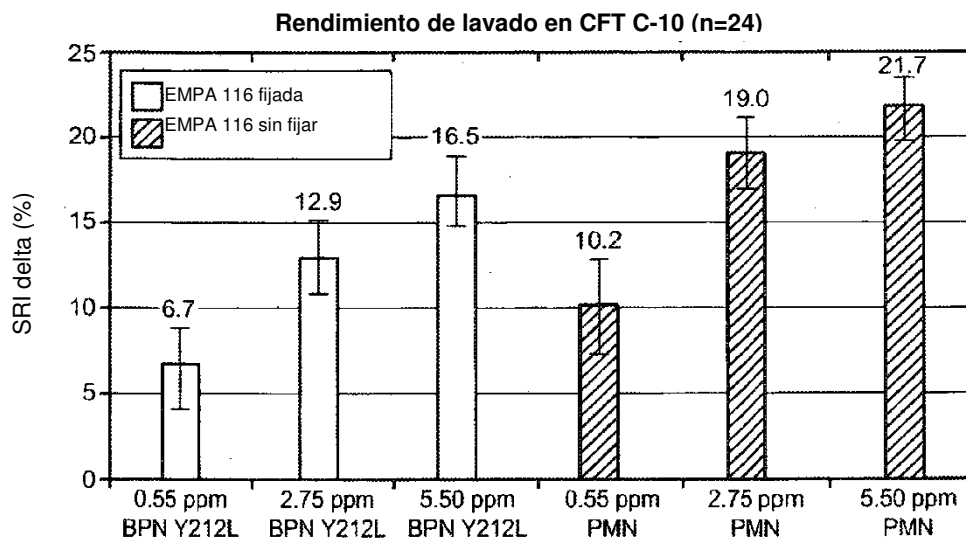
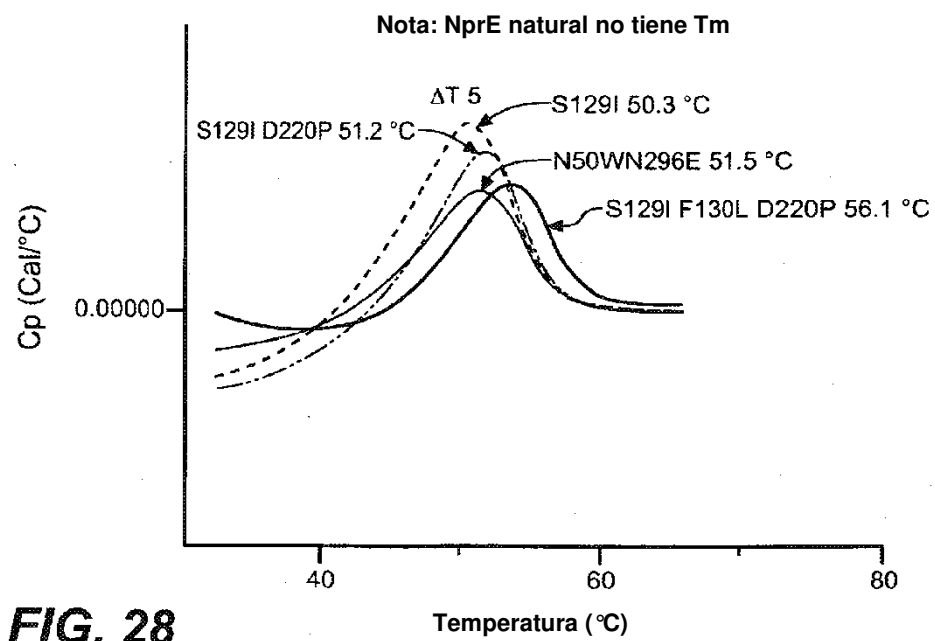
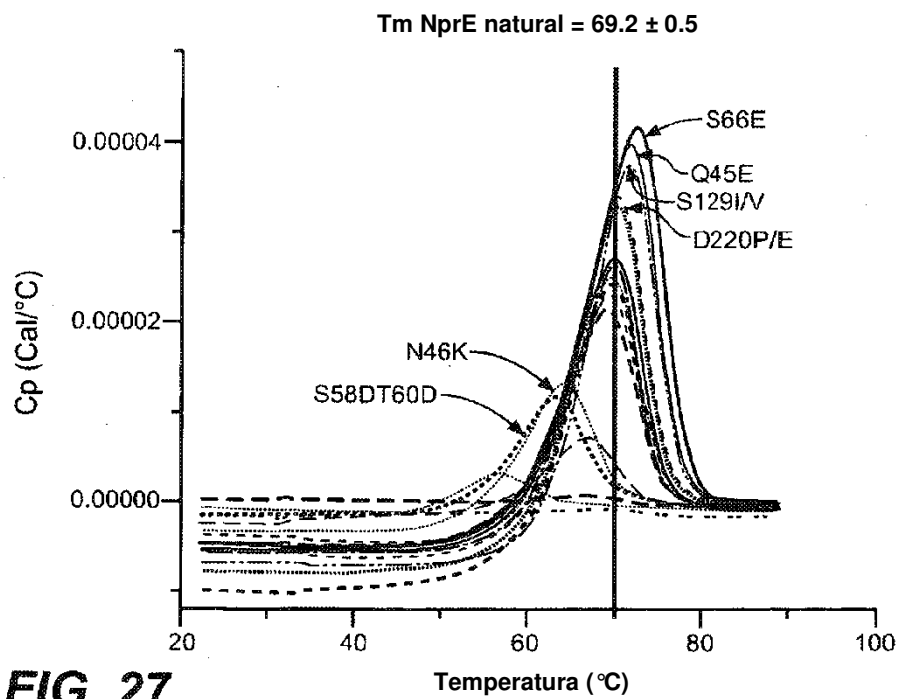


FIG. 26C



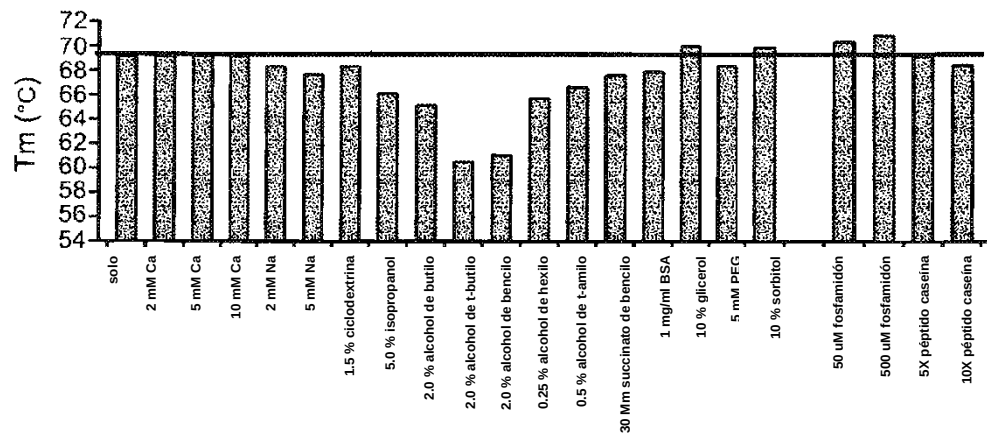


FIG. 29

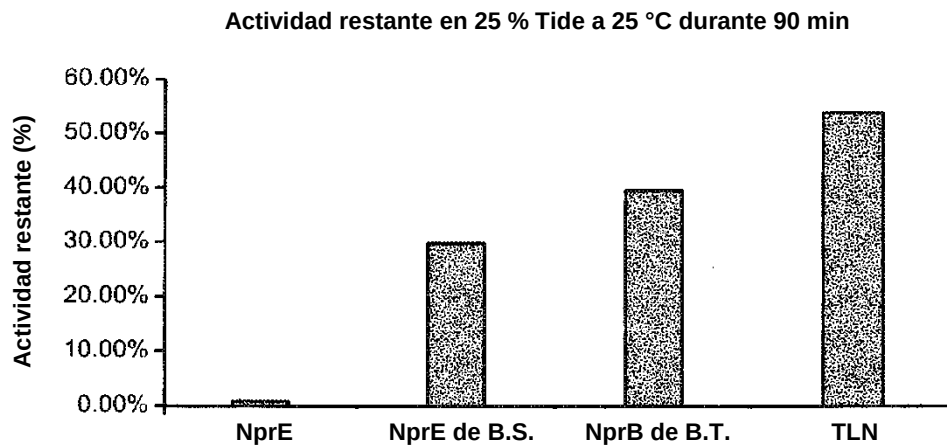


FIG. 30

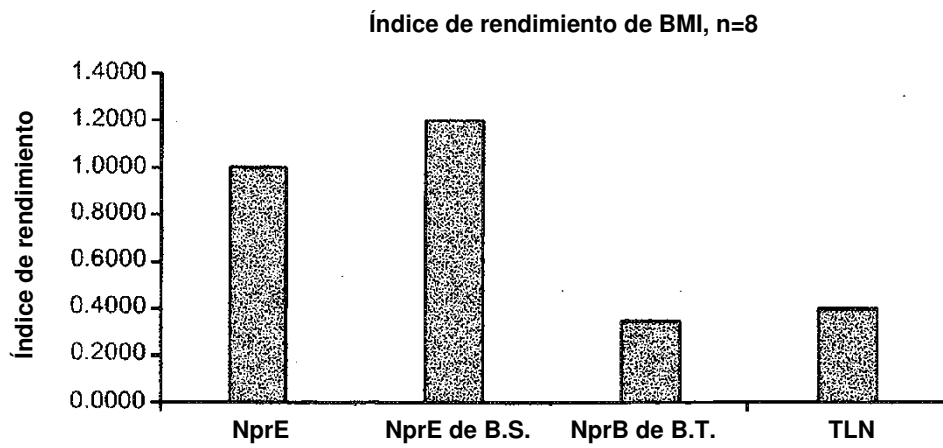


FIG. 31

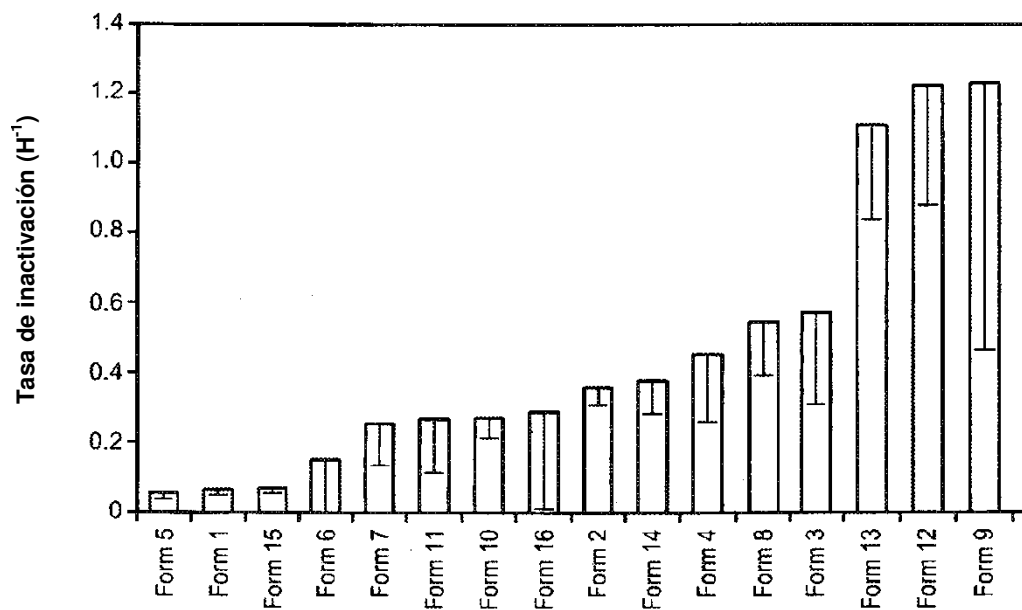


FIG. 32

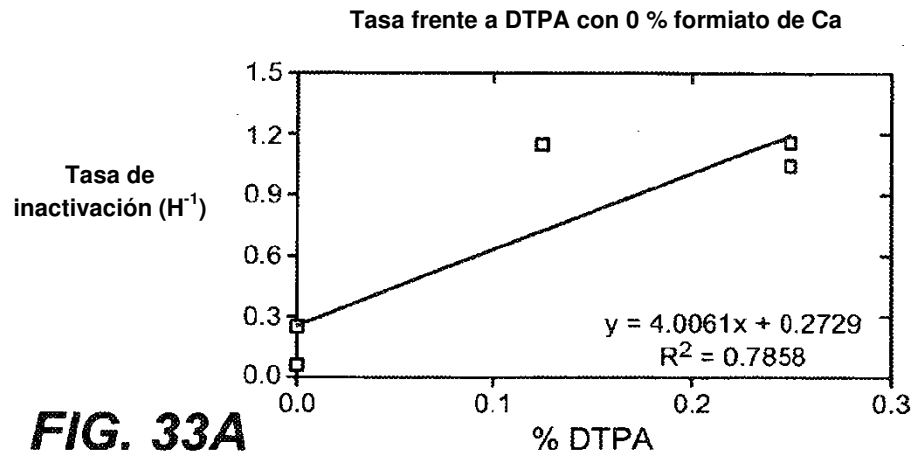


FIG. 33A

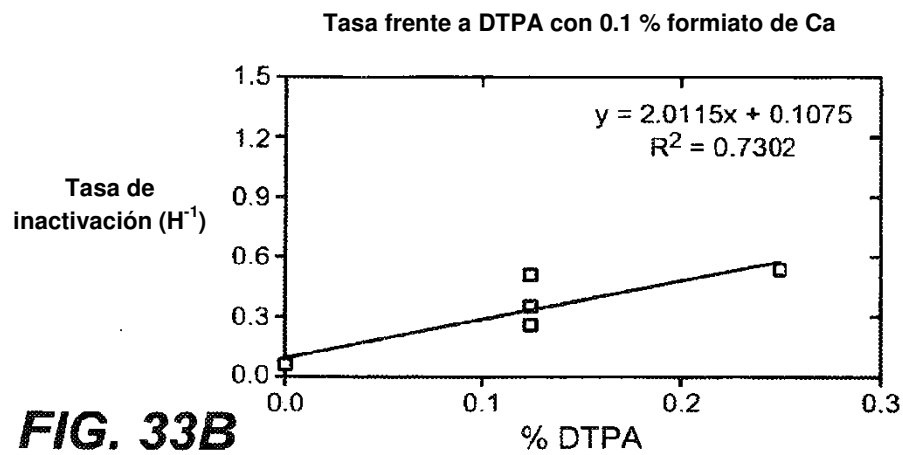


FIG. 33B

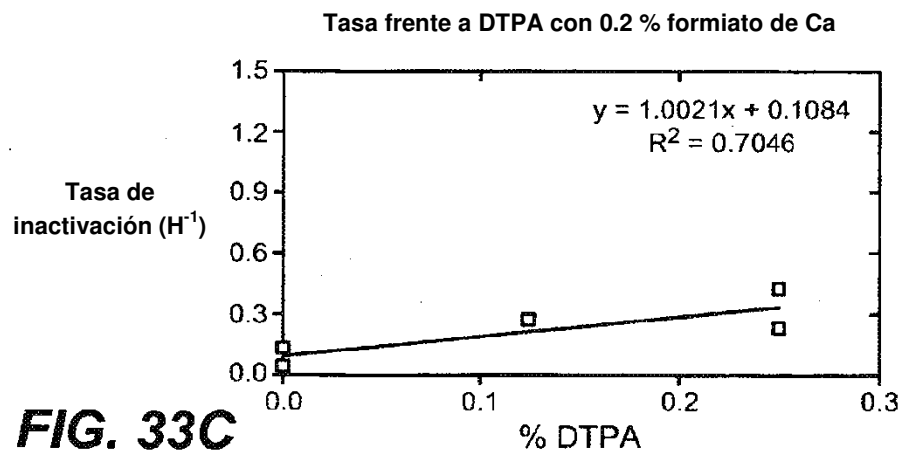


FIG. 33C

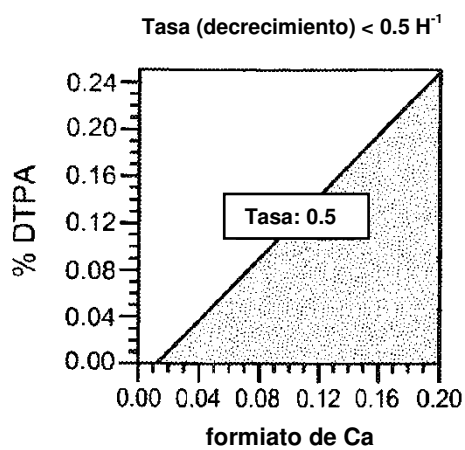


FIG. 34A

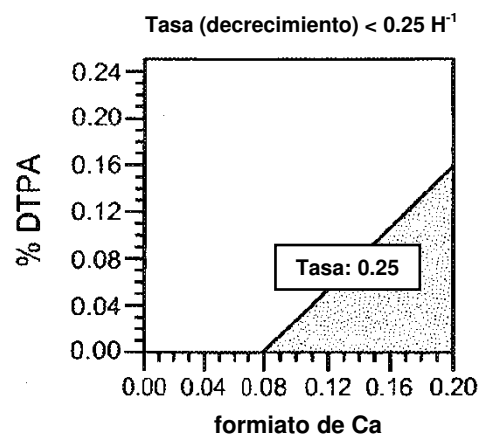


FIG. 34B

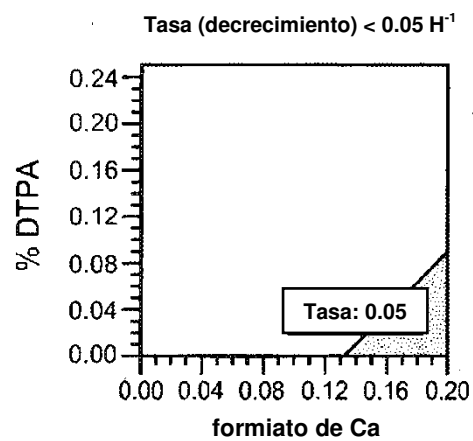


FIG. 34C

Fragmento 1:

AATTGTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTTNQFTT
SSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRRNSYDNKGCKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDCSF
 FSPLSGSMVDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFNDTEDWDIGEDITVSQPAL
RSLSNPTKYGPDPNFKNYKNLPNT (SEQ ID NO:222)

Fragmento 2 (desgastado):

DAGDYGGVHTNSGIPNKAAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTIVYLTPSSTFKDAKAALIQSARDLYG
 SQDAASVEAAWNAVGL (SEQ ID NO:223)

Fragmento 3:

AATTGTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTTNQFTT
SSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRRNSYDNKGCKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDCSF
 FSPLSGSMVDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFNDTEDWDIGEDITVSQPALRS
 (SEQ ID NO:224)

Fragmento 4 (deducido en función del tamaño):

AATTGTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTTNQFTT
SSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRRNSYDNKGCKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDCSF
 FSPLSGSMVDV (SEQ ID NO:225)

Fragmento 5:

LSNPTKYGPDPNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGIPNKAAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTIVYL
 TPSSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAASVEAAWNAVGL (SEQ ID NO:226)

FIG. 35