

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 011**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C11D 3/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011** **E 16177383 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 3095861**

54 Título: **Productos de consumo con variantes de proteasa**

30 Prioridad:

06.05.2010 US 332151 P

06.05.2010 US 332006 P

12.10.2010 US 392364 P

12.10.2010 US 392188 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2020

73 Titular/es:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (50.0%)

One Procter & Gamble Plaza

Cincinnati, OH 45202, US y

DANISCO US INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

SOUTER, PHILIP FRANK;

WARD, GLENN STEVEN;

POULOSE, AYROOKARAN JOSEPH;

ESTELL, DAVID A.;

KELLIS JR., JAMES T.;

COLLIER, KATHERINE D.;

CASCAO-PEREIRA, LUIS GUSTAVO;

ALEKSEYEV, VIKTOR YURYEVICH;

AMIN, NEELAM S.;

YAO, JIAN y

AUGUSTYN, KATHERINE

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 745 011 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

Productos de consumo con variantes de proteasa

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a productos de consumo que comprenden proteasas, así como métodos para tratar y/o limpiar una superficie utilizando dichos productos de consumo, como se define en las reivindicaciones anexas.

10 Antecedentes de la invención

Los fabricantes de detergentes incorporan proteasas en sus productos para proporcionar una buena limpieza de manchas (tales como sangre). Por ejemplo, el documento WO99/20771 se refiere a múltiples variantes de proteasa sustituidas con carga neta alterada para su uso en detergentes. Sin embargo, por motivos de sostenibilidad y de la tendencia de los consumidores a reducir las temperaturas de lavado, está resultando cada vez más difícil ofrecer beneficios aceptables al consumidor y sigue habiendo una necesidad de mejorar el perfil de limpieza y de frescura de estas composiciones de detergentes para el lavado de ropa. Los inventores han descubierto que la incorporación de, además, determinadas proteasas en productos de consumo, por ejemplo, una composición de detergente el lavado de ropa que puede, en un aspecto, comprender un agente de matizado, un abrillantador soluble en agua fría, un catalizador de blanqueo, una lipasa de primer lavado, una celulasa bacteriana de limpieza, un tensioactivo no iónico de Guerbet y/o una cápsula de perfume, mejora uno o más del perfil de limpieza, de blancura, de percepción de blancura y/o de frescor de dichos productos de consumo.

Resumen de la invención

Esta invención se refiere a una composición que comprende un material adyuvante y una variante de proteasa de agua fría, como se define en la reivindicación 1, y un método para tratar/limpiar una superficie, como se define en la reivindicación 5.

30 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 proporciona una alineación de las proteasas de referencia maduras que incluyen: subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (Id. de sec. n.º 2) y proteasa GG36 de subtilisina de *B. lentus* (Id. de sec. n.º 1). Cada posición de aminoácido de cada variante de proteasa descrita en la presente memoria, incluida cada variante de proteasa de agua fría, está numerada según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Figura 1, determinada por la alineación de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

La Figura 2 muestra el plásmido de expresión pHPLT-GG36.

La Figura 3 muestra el plásmido de expresión pRA68.

La Figura 4 muestra el plásmido de expresión pRA96.

Descripción detallada de la invención**Definiciones**

En la presente memoria, “producto de consumo” significa producto para el cuidado de tejidos y del hogar.

En la presente memoria, la expresión “producto para el cuidado de tejidos y del hogar” se refiere a productos para el cuidado de tejidos y del hogar y/o generalmente destinados a ser usados o consumidos en la forma en la que se venden y que son para tratar tejidos, superficies duras y cualesquiera otras superficies, y sistemas de limpieza para el cuidado y limpieza de superficies inanimadas, así como productos acondicionadores de tejidos y otros productos diseñados específicamente para el cuidado y mantenimiento de tejidos y productos para el cuidado del aire, que incluyen: cuidado del aire incluidos ambientadores y sistemas de liberación de perfume, cuidado del coche, cuidado de mascotas, cuidado del ganado, cuidado personal, cuidado de joyas, lavado de la vajilla, acondicionamiento de tejidos (incluidos suavizado y/o refrescado), detergente para el lavado de ropa, aditivo y/o cuidado de aclarado y de lavado de ropa, composiciones de limpieza de pre-tratamiento, limpieza y/o tratamiento de superficies duras, incluidos limpiadores para suelos y tazas de inodoro, limpiadores y/o tratamientos para vidrios, limpiadores y/o tratamientos para azulejos, limpiadores y/o tratamientos para cerámica y otros limpiadores para uso del consumidor o institucional. En algunas realizaciones, los productos para el cuidado de tejidos y del hogar son adecuados para su uso sobre heridas y/o la piel. “Productos para el cuidado de tejidos y del hogar” incluye productos para el consumidor e institucionales. Esta definición no incluye los productos (a) destinados a usarse para limpiar lentes de contacto o membranas de

ultrafiltración o (b) en curar heridas o para el tratamiento médico de afecciones de la piel. Dichos productos para el cuidado de tejidos y del hogar están destinados, en general, a ser usados o consumidos en la forma en que se venden.

En la presente memoria, la expresión “composición de limpieza y/o tratamiento” es un subconjunto de productos para el cuidado de tejidos y del hogar. Dichos productos incluyen, aunque no de forma limitativa, productos para el tratamiento de tejidos, superficies duras y cualquier otra superficie en el campo del cuidado de tejidos y del hogar, que incluye: cuidado del aire incluidos ambientadores y sistemas de liberación de perfume, cuidado del automóvil, lavado de vajilla, acondicionado de tejidos (incluidos suavizado y/o refrescado), detergente para el lavado de ropa, aditivos para el lavado de ropa y el aclarado y/o el cuidado de la misma, limpieza y/o tratamiento de superficies duras, incluidos limpiadores para suelos y tazas de inodoro, agentes de lavado multiuso en forma granular o en polvo o de “limpieza intensiva”, especialmente detergentes de limpieza; agentes para el lavado líquidos, en forma de gel o pasta universales, especialmente los tipos líquidos denominados de limpieza intensiva; detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado manual de vajillas o agentes para el lavado de vajillas de acción suave, especialmente los de tipo muy espumante; agentes para el lavado en lavavajillas, incluidos los diversos tipos en pastilla, granulado, líquido y coadyuvante de aclarado para uso doméstico e institucional: champús para automóviles o moquetas, limpiadores para cuartos de baño, incluidos limpiadores de inodoros; así como sustancias auxiliares de limpieza, tales como aditivos blanqueantes y “barras antimanchas” o de tipo tratamiento previo, productos cargados de sustratos tales como toallitas añadidas a la secadora de ropa.

En la presente memoria, la expresión “composición limpiadora y/o tratante para telas y/o superficies duras” es un subgrupo de composiciones limpiadoras y tratantes que incluye, salvo que se indique lo contrario, agentes para el lavado granulados o en polvo universales o “de limpieza intensiva”, especialmente detergentes de limpieza; agentes para el lavado líquidos, en forma de gel o pasta universales, especialmente los tipos líquidos denominados de limpieza intensiva; detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado manual de vajillas o agentes para el lavado de vajillas de acción suave, especialmente los de tipo muy espumante; agentes para el lavado en lavavajillas, incluidos los diversos tipos en pastilla, granulado, líquido y coadyuvante de aclarado para uso doméstico e institucional; agentes líquidos para limpieza y desinfección, champús para coches o moquetas, limpiadores de baño incluidos limpiadores de inodoros; productos de acondicionamiento de tejidos incluidos suavizantes y/o agentes refrescantes que pueden estar en forma líquida, sólida y/o toallitas para la secadora de ropa; así como sustancias auxiliares de limpieza, tales como aditivos blanqueantes y “barras antimanchas” o de tipo tratamiento previo, productos cargados de sustratos tales como toallitas añadidas a la secadora de ropa. Todos estos productos que se pueden aplicar pueden estar en forma estándar, concentrada o incluso altamente concentrada, hasta tal punto que dichos productos en algún aspecto determinado pueden no ser acuosos.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “variante de proteasa de agua fría” significa una variante de una proteasa precursora siendo la secuencia de dicha proteasa precursora al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º:1, teniendo dicha variante una o más de las siguientes características:

a) un índice de rendimiento del Método de ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2; de 1,1 a 10, de 1,1 a 8 o incluso de 1,1 a 5;

b) un índice de rendimiento del Método de ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2; de 1,1 a 10, de 1,1 a 8 o incluso de 1,1 a 5;

c) un índice de rendimiento del Método de ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,0 a 10, de 1,0 a 8 o incluso de 1,0 a 5;

d) un índice de rendimiento del Método de ensayo 6 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2; de 1,1 a 10, de 1,1 a 8 o incluso de 1,1 a 5,

el Método de ensayo 2, el Método de ensayo 3, el Método de ensayo 4 y el Método de ensayo 6 se describen explícitamente más adelante en la sección titulada “MÉTODOS DE ENSAYO”.

En la presente memoria, la proteasa de agua fría se muta de manera que las mutaciones consisten en uno de los siguientes conjuntos de mutaciones: T022A-N062E, T022A-P129E, T022A-L111V, T022A-S188D, A016S-T022A, T022A-E089P, T022A-G159E, T022A-A158E, T22A-L111V-G159E, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, T22A-S101A-S103G-V104L, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-

H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S128N-A158E-H249R, T022A-N062E-A158E, T022A-S101A-A158E-R186H-H249R, A016S-T022A-A158E-R186H-E271F, T022A-S128N-A158E-R186H, T022A-S128N-R186H-S188D-, T022A-A158E-R186H-H249R-E271F, T022A-V104L-A158E-H249R, T022A-V104L-R186H-S188D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D, en donde cada posición de aminoácido está numerada según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* de id. de sec. n.º 2.

Las proteasas de agua fría preferidas adecuadas para su uso en la presente invención tienen las características según el Método de ensayo 6 como se define en d) anteriormente.

- Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “variante de proteasa” significa una variante de una proteasa precursora, siendo dicha secuencia de proteasa precursora, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º 1, en donde cada posición de aminoácido está numerada según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.
- Como se utiliza en la presente memoria, los artículos tales como “un” y “una” cuando se usan en una reivindicación, se refieren a uno o más de aquello que se reivindica o que se describe.
- Como se utiliza en la presente memoria, los términos “incluyen”, “incluye” e “incluidos” deben entenderse como no limitativos.
- Como se utiliza en la presente memoria, el término “sólido” incluye productos en forma granular, polvo, pastilla y comprimidos.
- Como se utiliza en la presente memoria, el término “fluido” incluye productos en forma de líquido, gel, pasta y gas.
- En la presente memoria, el término “sitio” incluye tejidos, prendas de vestir y/o superficies duras.
- Salvo que se indique lo contrario, todos los niveles del componente o de la composición se refieren a una parte activa de ese componente o composición, y son excluyentes de impurezas, por ejemplo, disolventes residuales o subproductos, que puedan estar presentes en las fuentes comerciales de dichos componentes o composiciones.
- Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso, a menos que se indique de cualquier otra manera. Todos los porcentajes y relaciones se calculan basados en la composición total a menos que se indique de cualquier otra manera.
- Se entenderá que cada limitación numérica máxima dada en esta especificación incluye toda limitación numérica inferior, como si las limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresamente escritas en la presente memoria. Cada limitación numérica mínima proporcionada a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá cada limitación numérica superior, como si dichas limitaciones numéricas superiores estuvieran expresamente escritas en la presente memoria. Cada intervalo numérico proporcionado a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más limitado que se encuentra dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si todos los citados intervalos numéricos más limitados estuviesen expresamente escritos en la presente memoria.
- Productos de consumo
- Tal como se describe en la presente memoria, los productos de consumo que comprenden las proteasas variantes divulgadas en la presente memoria encuentran uso particular en la industria de la limpieza, por ejemplo, detergentes para el lavado de ropa y detergentes para vajilla. Estas aplicaciones colocan a las enzimas bajo varias tensiones ambientales. Las proteasas variantes empleadas en la presente invención proporcionan ventajas con respecto a muchas enzimas usadas actualmente, debido, al menos en parte, a su estabilidad en diversas condiciones.
- Claramente, existe una variedad de condiciones para lavado que incluyen la variación de formulaciones de detergentes, volúmenes de agua para lavado, temperaturas del agua para lavado y períodos de tiempo de lavado, a los cuales se exponen las proteasas involucradas en el lavado. Adicionalmente, las formulaciones detergentes usadas en distintas áreas geográficas tienen distintas concentraciones de sus componentes relevantes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, los detergentes europeos tienen, de forma típica, aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes de detergente en el agua de lavado, mientras que los detergentes japoneses tienen, de forma típica, aproximadamente 667 ppm de componentes de detergente en el agua de lavado. En Norteamérica, particularmente, en los EE. UU., los detergentes tienen, de forma típica, aproximadamente 975 ppm de componentes de detergente presentes en el agua de lavado.
- Un sistema con concentración detergente baja incluye detergentes en donde menos de aproximadamente 800 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses se consideran, de forma típica, sistemas con concentración detergente baja debido a que tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.
- Una concentración media de detergente incluye detergentes en donde los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado a entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm. Los detergentes de Norteamérica se consideran, generalmente, sistemas con concentración detergente media debido a que tienen aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Brasil tiene, de forma típica, aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.
- Un sistema con concentración de detergente alta incluye detergentes en donde más de aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Generalmente, se considera que los detergentes europeos son sistemas con concentración de detergente alta debido a que tienen aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

Los detergentes latinoamericanos son, generalmente, mejoradores de detergente de fosfato con contenido alto de espuma y la concentración de los detergentes usados en Latinoamérica puede ser tanto media como alta debido a que se encuentran en el intervalo de 1500 ppm a 6000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Como se mencionó anteriormente, Brasil tiene, de forma típica, aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Sin embargo, otras regiones con mejoradores de detergente de fosfato con contenido alto de espuma no limitadas a otros países de América Latina, pueden tener sistemas con concentración de detergente alta de hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

En vista de lo anterior, es evidente que las concentraciones de composiciones detergentes en las soluciones típicas de lavado en todo el mundo varían de menos de aproximadamente 800 ppm de composición detergente ("regiones con concentración baja de detergente"), por ejemplo, aproximadamente 667 ppm en Japón, hasta entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm ("regiones con concentración media de detergente"), por ejemplo, aproximadamente 975 ppm en los EE. UU. y aproximadamente 1500 ppm en Brasil hasta más de aproximadamente 2000 ppm ("regiones con concentración alta de detergente"), por ejemplo, de aproximadamente 4500 ppm a aproximadamente 5000 ppm en Europa y aproximadamente 6000 ppm en regiones con mejoradores de fosfato con contenido alto de espuma.

Las concentraciones de las soluciones de lavado típicas se determinan empíricamente. Por ejemplo, en los EE. UU. una lavadora automática típica soporta un volumen de aproximadamente 64,4 l de solución de lavado. Por consiguiente, para obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente dentro de la solución de lavado se debe agregar aproximadamente 62,79 g de composición detergente a los 64,4 l de solución de lavado. Esta cantidad es la cantidad típica que determina el consumidor en el agua de lavado con el uso de la taza medidora provista con el detergente.

Como ejemplo adicional, las distintas regiones usan temperaturas de lavado diferentes. En Japón, la temperatura del agua de lavado es, de forma típica, inferior a la temperatura que se usa en Europa. Por ejemplo, la temperatura del agua de lavado en Norteamérica y Japón es, de forma típica entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 °C (p. ej., aproximadamente 20 °C), mientras que la temperatura del agua de lavado en Europa es, de forma típica, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 °C (p. ej., aproximadamente 40 °C). Sin embargo, con el propósito de ahorrar energía, muchos consumidores ahora realizan el lavado con agua fría. Además, en algunas otras regiones, el agua fría se usa, de forma típica, para el lavado de ropa, así como además en aplicaciones para el lavado de vajilla. En algunas realizaciones, el "lavado con agua fría" de la presente invención utiliza lavados a temperaturas de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, así como todas las demás combinaciones dentro del intervalo de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C y todos los intervalos dentro de 10 °C a 40 °C.

Como un ejemplo adicional, las distintas geografías tienen, de forma típica, durezas del agua diferentes. La dureza del agua se describe, usualmente, en términos de los granos por galón de mezcla $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. La dureza es una medida de la cantidad de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) en el agua. La mayor parte del agua en los EE. UU. es dura, pero el grado de dureza varía. El agua moderadamente dura (60-120 ppm) a dura (121-181 ppm) tiene de 60 a 181 partes por millón (partes por millón convertidas a granos por galón de EE. UU. es núm. de ppm dividido por 17,1 equivalente a granos por galón) de minerales de dureza.

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

La dureza del agua en Europa es, de forma típica, mayor que aproximadamente 10,5 (p. ej., de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 20,0) granos por galón de mezcla $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (p. ej., aproximadamente 15 granos por galón de mezcla $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). La dureza del agua en Norteamérica es, de forma típica, superior a la dureza del agua japonesa, pero inferior a la dureza del agua en Europa. Por ejemplo, la dureza del agua en Norteamérica puede estar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 granos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 granos o de aproximadamente 6 granos. La dureza del agua en Japón es, de forma típica, inferior a la dureza del agua en Norteamérica, usualmente, inferior a aproximadamente 4, por ejemplo, aproximadamente 3 granos por galón de mezcla $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona productos de consumo que muestran un rendimiento de lavado sorprendente en al menos un conjunto de condiciones de lavado (p. ej., temperatura del agua, dureza del agua y/o concentración de detergente).

En algunas realizaciones, los productos de consumo de la presente invención son comparables en cuanto a su rendimiento de lavado con otros productos de consumo que comprenden otras proteasas subtilisin. En algunas

realizaciones, los productos de consumo de la presente invención muestran un mejor rendimiento de lavado en comparación con productos de consumo que comprenden proteasas subtilisinas actualmente disponibles en el mercado. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, los productos de consumo que comprenden las proteasas variantes proporcionadas en la presente memoria, muestran una limpieza mejorada debido, al menos en parte, a una mejora de la estabilidad oxidativa, una mejora de la estabilidad térmica, una mejora de las capacidades de limpieza en diversas condiciones y/o una mejora de la estabilidad quelante de las enzimas empleadas.

Productos de consumo

En todas sus formas, las composiciones divulgadas en la presente memoria son productos de consumo.

En un aspecto, se divulga una composición que comprende un material adyuvante y una variante de proteasa de agua fría, siendo dicha composición un producto de consumo.

El Método de ensayo 2, el Método de ensayo 3, el Método de ensayo 4 y el Método de ensayo 6 se describen más adelante en la sección titulada “MÉTODOS DE ENSAYO”.

En un aspecto de dicha composición, dicho material adyuvante puede comprender un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en: un encapsulado que comprende un perfume, un agente matizante, tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, agentes quelantes, agentes inhibidores de transferencia de colorantes, dispersantes, enzimas adicionales, estabilizadores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación/anti-redeposición de manchas de arcilla, abrillantadores, supresores de espuma, colorantes, perfumes, agentes elastizantes de estructura, suavizantes de tejidos, vehículos, hidrótrofos, coadyuvantes de elaboración, disolventes, pigmentos y mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicha composición, dicha composición puede comprender un material adyuvante seleccionado del grupo que consiste en:

- a) encapsulados de perfume;
- b) agentes de matización de tejidos;
- c) abrillantadores solubles en agua fría;
- d) un catalizador de blanqueo que puede comprender un catalizador metálico tal como un catalizador de metal de transición, o más preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en cationes de iminio, poliones de iminio; iones híbridos de iminio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas azucaradas cíclicas y mezclas de las mismas;
- e) lipasas de primer lavado;
- f) celulasas bacterianas de limpieza;
- g) tensioactivos no iónicos de Guerbet; y
- h) mezclas de los mismos.

Las proteasas preferidas comprenden al menos una, o incluso dos o más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en N062E, S101D, P129E, A158E, G159D/E, y/o S188D. Dichas proteasas son especialmente preferidas para su incorporación en composiciones detergentes adecuadas para su adición al agua para preparar una solución de lavado que tenga preferiblemente una baja fuerza iónica o una baja concentración de detergente. Por lo tanto, en un aspecto preferido, estas proteasas formarán parte de una composición detergente que se añade al agua, ya sea para un proceso de lavado a mano o a máquina, de forma típica en una lavadora, para formar una solución de lavado, cuya conductividad es de aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 3 mS/cm, de aproximadamente 0,3 mS/cm a aproximadamente 2,5 mS/cm o incluso de aproximadamente 0,5 mS/cm a aproximadamente 2 mS/cm.

En un aspecto adicional, dichas proteasas que comprenden al menos una, o incluso dos o más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en N062E, S101D/R, P129E, A158E, G159D/E y/o S188D, tienen una carga de 0, -1, -2, -3, -4 o -5, preferiblemente, de 0, -1, -2 o -3, con la máxima preferencia de -1 o -2 en relación con la enzima de la id. de sec. n.º 1. Las mutaciones preferidas para conseguir una carga neta deseada comprenden una, dos o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S024R, G118R, Q245R, H249R y E271F.

Según la presente descripción, las proteasas especialmente preferidas para usar en la descripción:

(a) comprenden una o dos o más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en N062E, S101D, P129E, A158E, G159D/E, y/o S188D; y/o

(b) tienen una carga de 0, -1, -2, -3, -4 o -5, preferiblemente, 0, -1, -2 o -3, con la máxima preferencia de, -1 o -2 en relación con la enzima de la id. de sec. n.º 1; y/o

(c) comprenden una, dos, tres o más mutaciones para conseguir una carga neta deseada seleccionada del grupo que consiste en S024R, G118R, Q245R, H249R y/o E271F.

Por “mutaciones para conseguir una carga neta deseada” se entiende que cuando la variante de enzima se compara con la subtilisina proteasa GG36 de *Bacillus lentus*, la carga neta total de la variante en relación con la subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* se puede ajustar dentro del intervalo preferido por medio de la selección de una o más mutaciones adicionales seleccionadas, preferiblemente, de las mutaciones identificadas, por ejemplo, enumeradas en el apartado (c) anterior.

Preferiblemente, estas proteasas preferidas forman parte de una composición detergente que se añade al agua, ya sea para un proceso de lavado a mano o a máquina, de forma típica en una lavadora, para formar una solución de lavado, cuya conductividad es de aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 3 mS/cm, de aproximadamente 0,3 mS/cm a aproximadamente 2,5 mS/cm o incluso de aproximadamente 0,5 mS/cm a aproximadamente 2 mS/cm.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que estas mutaciones para conseguir una carga neta deseada, proporcionan un mejor rendimiento global de la proteasa asegurando una carga óptima de la molécula en condiciones de baja fuerza iónica, o soluciones de lavado que comprenden una baja concentración de detergente, es solo mediante la combinación cuidadosa de determinadas mutaciones, de las cuales estas son preferidas, que se pueden obtener dichas proteasas preferidas.

En otro aspecto, los inventores han descubierto que las proteasas preferidas comprenden al menos una o dos o más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en S024R, N043R, Q245R y/o H249R. Dichas proteasas son particularmente preferidas para su incorporación en composiciones detergentes adecuadas para su adición al agua para preparar un licor de lavado que tenga preferiblemente una alta fuerza iónica o una alta concentración de detergente. Por ejemplo, estas proteasas preferidas pueden formar parte de una composición detergente que se añade al agua, ya sea para lavado a mano o lavado a máquina, de forma típica en una lavadora, para formar una solución de lavado, cuya conductividad es de aproximadamente 3 mS/cm a aproximadamente 30 mS/cm, de aproximadamente 3,5 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm o incluso de aproximadamente 4 mS/cm a aproximadamente 10 mS/cm.

En un aspecto adicional, dichas proteasas comprenden al menos una, o dos o incluso más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en S024R, N043R, Q245R y/o H249R, tienen una carga de 0, +1, +2, +3, +4 o +5, preferiblemente, +1, +2 o +3, con la máxima preferencia de, +2 en relación con la enzima de la id. de sec. n.º 1. Las mutaciones preferidas para conseguir una carga neta deseada comprenden N076D. Preferiblemente, estas proteasas forman parte de una composición detergente que se añade al agua, ya sea para un proceso de lavado a mano o a máquina, de forma típica en una lavadora, para formar una solución de lavado, cuya conductividad es de aproximadamente 3 mS/cm a aproximadamente 30 mS/cm, de aproximadamente 3,5 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm o incluso de aproximadamente 4 mS/cm a aproximadamente 10 mS/cm.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que estas mutaciones para conseguir una carga neta deseada, proporcionan un mejor rendimiento global de la proteasa en condiciones de alta fuerza iónica o de alta concentración de detergente. Es solo mediante la combinación cuidadosa de determinadas mutaciones, de las cuales estas son preferidas, que se pueden obtener dichas proteasas preferidas.

En un aspecto de dicha composición, la variante de proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º 1, y en donde la carga neta total de la variante de proteasa es 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, o -5, en relación con la carga neta total de la subtilisina GG36 proteasa de *Bacillus lentus*, y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de proteasa están numeradas según la numeración de las posiciones de aminoácidos correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la id. de sec. n.º 2 que se determina por alineación de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

En un aspecto de dicha composición, dicha composición comprende una segunda proteasa no inmunoequivalente seleccionada del grupo que comprende:

a) subtilisinas (EC 3.4.21.62);

b) proteasas similares a tripsina o similares a quimiotripsina;

c) metaloproteasas; y

d) mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicha composición, dicha composición comprende una segunda proteasa no inmunoequivalente seleccionada del grupo que comprende:

a) subtilisin (EC 3.4.21.62) derivadas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii*;

b) tripsina proteasas y/o quimiotripsina proteasas de *Cellulomonas*;

c) metaloproteasas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*; y

d) mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicha composición, dicha composición comprende una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en hemicelulasas, peroxidasas, proteasas, celulasas, celobiosa deshidrogenasas, xiloglucanasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas, pectinasas, mananasas, pectato liasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tanasas, pentosanasas, liquenasas, glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa, amilasas y mezclas de las mismas.

En un aspecto de dicha composición, dicha enzima adicional se selecciona del grupo que consiste en:

a) lipasas de primer lavado;

b) alfa-amilasas;

c) celulasas bacterianas de limpieza; y

d) mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicha composición, con respecto a dicho(s) material(es) adyuvante(s), en dicha composición

a) dicho encapsulado comprende un perfume que comprende una microcápsula de perfume;

b) dicho agente de matizado comprende un material seleccionado del grupo que consiste en tintes básicos, ácidos, hidrófobos, directos y poliméricos y tintes conjugados que tienen una longitud de onda de absorción máxima de 550 nm a 650 nm y mezclas de los mismos;

c) dicho tensioactivo detergente comprende un material seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos detergentes aniónicos, tensioactivo detergente no iónico, tensioactivos detergentes catiónicos, tensioactivos detergentes de ion híbrido y tensioactivos detergentes anfóteros y mezclas de los mismos;

d) dicho aditivo reforzante de la detergencia comprende un material seleccionado del grupo que consiste en zeolitas, fosfatos y mezclas de los mismos;

e) dicha sal de silicato comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicato de sodio, silicato de potasio y mezclas de los mismos;

f) dicho abrillantador comprende, preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en abrillantadores solubles en agua fría y mezclas de los mismos;

g) dicho polímero de carboxilato comprende un material seleccionado del grupo que consiste en copolímero aleatorio de maleato/acrilato u homopolímero de poliácido acrílico y mezclas de los mismos;

h) dicho polímero de desprendimiento de la suciedad comprende un material seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de tereftalato y mezclas de los mismos;

i) dicho polímero celulósico comprende un material seleccionado del grupo que consiste en alquilcelulosa, alquilalcoxilalquilcelulosa, carboxialquilcelulosa, alquilcarboxialquilcelulosa y mezclas de los mismos;

j) dicho catalizador de blanqueo comprende un catalizador de metal de transición o un ligando para la formación de un catalizador de metal de transición, o, preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en cationes iminio, poliiones de iminio; iones híbridos de iminio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas azucaradas cíclicas y mezclas de las mismas;

k) dicho activador de blanqueo comprende un material seleccionado del grupo que consiste en dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoil oxibenzoico o sus sales, 3,5,5-trimetil hexanoiloxibenceno sulfonato, tetraacetil etilendiamina (TAED), nonanoiloxibenceno sulfonato (NOBS) y mezclas de los mismos;

l) dicha fuente de peróxido de hidrógeno comprende un material seleccionado del grupo que consiste en sales inorgánicas de perhidrato, incluidas sales de metales alcalinos tales como sales sódicas de perborato (generalmente mono- o tetra-hidrato), de percarbonato, de persulfato, de perfosfato, de persilicato y mezclas de las mismas;

m) dicho quelante comprende un material seleccionado del grupo que consiste en DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), HEDP (ácido hidroxietano difosfónico), DTPMP (ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)), ácido etilendiaminodisuccínico (EDDS), sal hidratada disódica del ácido 1,2-dihidroxibenceno-3,5-disulfónico y derivados de dichos quelantes; y

n) mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicha composición, dicha composición comprende un agente de matizado de tejidos seleccionado del grupo que consiste en

a) tintes;

b) conjugados de tinte-arcilla que comprenden al menos un tinte catiónico-básico y una arcilla de esmectita; y

c) mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicha composición, dicha composición comprende un agente de matizado de tejidos seleccionado del grupo que consiste en

a) colorantes de molécula pequeña; tintes poliméricos y mezclas de los mismos;

b) conjugados de tinte-arcilla que comprenden al menos un tinte catiónico-básico y una arcilla de esmectita; y

c) mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicha composición detergente sólida para el lavado de ropa, dicha composición comprende, basándose en el peso total de la composición:

a) de aproximadamente 0,0005 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso, de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente 0,002 % en peso a aproximadamente 0,03 % en peso de dicha variante de proteasa; y

b) uno o más de los siguientes:

(i) de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso del agente de matizado de tejidos;

(ii) de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de cápsulas de perfume;

(iii) de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 1 % en peso de abrillantadores solubles en agua fría;

(iv) de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de catalizadores de blanqueo;

(v) de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de lipasas de primer lavado;

(vi) de aproximadamente 0,00003 % en peso a 0,1 % en peso de celulasas bacterianas de limpieza;

(vii) de aproximadamente 0,05 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de tensioactivos no iónicos de Guerbet.

Se divulga una composición de acuerdo con cualquiera de los productos de consumo divulgados en la presente memoria, en donde dicha composición es una dosis unitaria única o de varios compartimientos.

Una composición de acuerdo con cualquiera de los productos de consumo desvelados en la presente memoria, en donde dicha composición es una dosis unitaria de varios compartimientos, en donde la variante de proteasa se encuentra en un compartimento diferente a cualquier fuente de peróxido de hidrógeno y/o quelante.

En el método de la presente invención, la solución de lavado acuosa comprende una composición como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, dicho producto de consumo puede ser un detergente para el lavado de ropa granulado o en polvo.

5 En un aspecto, cualquiera de los productos de consumo divulgados en la presente memoria puede estar en forma de una dosis unitaria de varios compartimentos. En un aspecto de dicha dosis unitaria de varios compartimentos, la variante de proteasa puede estar en un compartimento diferente al de cualquier enzima y/o quelante adicional.

10 En un aspecto, dichas composiciones pueden ser un detergente líquido para el lavado de ropa, un producto para lavar vajilla y/o un detergente granulado o en polvo.

En un aspecto, cualquiera de los productos de consumo divulgados en la presente memoria puede estar en forma de una dosis unitaria de varios compartimentos. En un aspecto de dicha dosis unitaria de varios compartimentos, la proteasa puede estar en un compartimento diferente al de cualquier enzima y/o quelante adicional.

15 El producto de consumo puede adoptar cualquier forma incluyendo un líquido o un sólido. El producto de consumo puede estar en forma de una bolsa de dosis unitaria, especialmente cuando está en forma de líquido y de forma típica, el producto de consumo está al menos parcialmente o incluso completamente, encerrado por una bolsa soluble en agua.

20 En uno o más aspectos del producto de consumo mencionado anteriormente, dicho producto de consumo puede tener cualquier combinación de parámetros y/o características detalladas anteriormente.

25 La carga de las variantes de proteasa se expresa en relación a la proteasa de la subtilisina GG36 de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º 1. Los aminoácidos que confieren una sola carga negativa son D y E y los que confieren una única carga positiva son R, H y K. Cualquier cambio de aminoácido en comparación con la Id. de sec. n.º 1 que cambia una carga se usa para calcular la carga de la variante de proteasa. Por ejemplo, la introducción de una mutación de carga negativa a partir de una posición neutra de tipo silvestre, añadirá una carga neta de -1 a la variante de proteasa, mientras que la introducción de una mutación de carga negativa (D o E) a partir de un resto de aminoácido positivo de tipo silvestre (R, H o K) añadirá una carga neta de -2. Sumando los cambios de carga de todos los restos de aminoácidos que son diferentes para la variante de proteasa en comparación con la proteasa de la subtilisina GG36 de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º 1, proporciona el cambio de carga de la variante de proteasa.

35 El intervalo de cargas preferidas para proteasas que se usa en soluciones detergentes de lavado de ropa de baja conductividad es de -5, -4, -3, -2, -1, 0, particularmente -2, -1;

El intervalo de cargas preferidas para proteasas que se usa en soluciones detergentes de lavado de ropa de alta conductividad es de +5, +4, +3, +2, +1, 0, particularmente +2, +1. Al seleccionar correctamente la carga, se puede obtener de forma inesperada una mejora de los niveles de rendimiento de limpieza.

40 Las soluciones de baja conductividad se definen por tener una conductividad de aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 3 mS/cm, de aproximadamente 0,3 mS/cm a aproximadamente 2,5 mS/cm o incluso de aproximadamente 0,5 mS/cm a aproximadamente 2 mS/cm.

45 Las soluciones de alta conductividad se definen por tener una conductividad de aproximadamente 3 mS/cm a aproximadamente 30 mS/cm, de aproximadamente 3,5 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm o incluso de aproximadamente 4 mS/cm a aproximadamente 10 mS/cm.

Métodos para preparar proteasas de agua fría

50 Se conocen en la técnica varios métodos adecuados para generar secuencias de polinucleótidos modificados de la presente invención, incluidos, aunque no de forma limitativa, la mutagénesis por saturación de sitios, mutagénesis de barrido, mutagénesis de inserción, mutagénesis de delección, mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida al sitio y de evolución dirigida, así como otros diversos enfoques de recombinación. Los métodos usados comúnmente incluyen barajado de ADN (véase, Stemmer, Proc Natl Acad Sci USA, 25:10747-51 [1994]), métodos basados en la recombinación no homóloga de genes (*p. ej.*, ITCHY) (Ostermeier y col., Bioorg Med Chem, 7:2139-44 [1999]), SCRATCHY (Lutz y col., Proc Natl Acad Sci USA, 98:11248-53 [2001]), SHIPREC (Sieber y col., Nat Biotechnol., 19:456-60 [2001]), y NRR (Bittker y col., Nat Biotechnol., 20:1024-9 [2001]; Bittker y col., Proc Natl Acad Sci. USA, 101:7011-6 [2004]) y métodos que se basan en el uso de oligonucleótidos para insertar mutaciones, delecciones y/o inserciones aleatorias y dirigidas (Ness y col., Nat Biotechnol., 20:1251-5 [2002]; Coco y col., Nat Biotechnol., 20:1246-50 [2002]; Zha y col., ChemBiochem, 3:34-9 [2003], Glaser y col., J Immunol., 149:3903-13 [1992], Sondek y Shortle, Proc Natl Acad Sci, 89:3581-5 [1992], Yáñez y col., Nucleic Acids Res., 32:e158 [2004], Osuna y col., Nucleic Acids Res., 32:e136 [2004], Gaytán y col., Nucleic Acids Res., 29:E9 [2001], y Gaytán y col., Nucleic Acids Res., 30:e84 [2002]).

65 En algunas realizaciones, el polinucleótido parental de longitud completa se liga a un plásmido de expresión adecuado y se usa el siguiente método de mutagénesis para facilitar la construcción de la proteasa modificada de la presente invención, aunque se pueden usar otros métodos. El método se basa en el descrito por Pisarchik y col. (Pisarchik y col.,

Prot. Eng. Des. Select., 20:257-265 [2007]). En algunas realizaciones, se proporciona una ventaja añadida, en tanto que la enzima de restricción usada en la presente memoria corta por fuera de su secuencia de reconocimiento, lo que permite la digestión de prácticamente cualquier secuencia de nucleótidos y previene la formación de una cicatriz en el sitio de restricción. En primer lugar, como se describe en la presente memoria, se obtiene un gen de origen natural que codifica la proteasa de longitud completa, se secuencia y se barre para determinar uno o más puntos en los que se desea efectuar una mutación (eliminación, inserción, sustitución o una combinación de las mismas) en uno o más aminoácidos. La mutación del gen para cambiar su secuencia para conformarlo a la secuencia deseada se consigue mediante la extensión del cebador, de acuerdo con los métodos normalmente conocidos. Los fragmentos a la izquierda y a la derecha del punto o puntos de mutación deseados se amplifican mediante PCR y para incluir el sitio de restricción *Eam1104I*. Los fragmentos izquierdo y derecho se digieren con *Eam1104I*, para generar una pluralidad de fragmentos que tienen salientes complementarios de tres bases, que se agrupan y ligan a continuación, para generar una biblioteca de secuencias modificadas que contienen una o más mutaciones. Este método previene la aparición de mutaciones de desplazamiento de fase. Además, este método simplifica el procedimiento de mutagénesis, debido a que todos los oligonucleótidos se pueden sintetizar, de forma que tengan los mismos sitios de restricción y no se requieran conectores sintéticos para crear los sitios de restricción, como se requieren en algunos otros métodos.

En los ejemplos 31 a 43 se proporciona un conjunto no limitante de métodos para producir las proteasas de agua fría.

Agentes de matizado de tejidos adecuados

Los abrillantadores ópticos fluorescentes emiten, al menos, algo de luz visible. En cambio, los agentes de matizado de tejidos pueden alterar el tinte de una superficie puesto que absorben, al menos, una parte del espectro de la luz visible. Los agentes de matizado de tejidos adecuados incluyen tintes, conjugados de tinte-arcilla, y pigmentos que satisfacen las necesidades del Método de ensayo 1 en la sección de métodos de ensayo de la presente memoria descriptiva. Los tintes adecuados incluyen pequeñas moléculas de tinte y moléculas poliméricas. Los tintes de moléculas pequeñas adecuados tintes seleccionados del grupo que consiste en tintes que se encuentran en las clasificaciones de índice de color (C.I.) de Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet y Basic Red o mezclas de los mismos.

Los colorantes matizantes se formulan para depositarse sobre los tejidos a partir del licor de lavado para mejorar la percepción de blancura del tejido. En un aspecto, el colorante del agente matizante es azul o violeta. En un aspecto, el colorante o colorantes de sombreado pueden tener una longitud de onda de absorción máxima de 550 nm a 650 nm o en un aspecto, de 570 nm a 630 nm. Una combinación de tintes, que en conjunto, tienen efecto visual sobre el ojo humano, como un colorante único que tiene una longitud de onda de absorción máxima sobre poliéster de 550 nm a 650 nm, o de 570 nm a 630 nm. Esto puede proporcionarse, por ejemplo, mezclando un tinte rojo y un tinte verde-azulado para obtener una tonalidad azul o violeta.

Los colorantes son moléculas orgánicas coloreadas que son solubles en medios acuosos que contienen tensioactivos. Los colorantes se describen en "Industrial Dyes", Wiley VCH 2002, K. Hunger (editor). Los colorantes se enumeran en el índice internacional del color, publicado por la Sociedad de tintoreros y coloristas y la asociación americana de químicos y coloristas textiles. Los colorantes se seleccionan de forma típica de las clases de colorantes básicos, ácidos, hidrófobos, directos y poliméricos y conjugados de colorantes. Los expertos en la técnica de formulación de detergentes son capaces de seleccionar tintes de matizado adecuados a partir de estas publicaciones. Los colorantes de matización poliméricos están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Milliken, Spartanburg, Carolina del Sur, EE. UU.

Los ejemplos de colorantes adecuados son el direct violet 7, direct violet 9, direct violet 11, direct violet 26, direct violet 31, direct violet 35, direct violet 40, direct violet 41, direct violet 51, direct violet 66, direct violet 99, acid violet 50, acid blue 9, acid violet 17, acid black 1, acid red 17, acid blue 29, solvent violet 13, disperse violet 27 disperse violet 26, disperse violet 28, disperse violet 63 y disperse violet 77, basic blue 16, basic blue 65, basic blue 66, basic blue 67, basic blue 71, basic blue 159, basic violet 19, basic violet 35, basic violet 38, basic violet 48; basic blue 3, basic blue 75, basic blue 95, basic blue 122, basic blue 124, basic blue 141, tintes de triazolío, reactive blue 19, reactive blue 163, reactive blue 182, reactive blue 96, Liquitint® Violet CT (Milliken, Spartanburg, EE. UU.) y Azo-CM-Celulosa (Megazyme, Bray, República de Irlanda).

Los agentes de matizado de tejidos anteriormente mencionados pueden usarse en combinación (puede usarse cualquier mezcla de agentes de matizado de tejidos). Pueden adquirirse agentes de matizado de tejidos adecuados de Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.; Ciba Specialty Chemicals, Basel, Suiza; BASF, Ludwigshafen, Alemania; Dayglo Color Corporation, Mumbai, India; Organic Dyestuffs Corp., East Providence, Rhode Island, EE. UU.; Dystar, Frankfurt, Alemania; Lanxess, Leverkusen, Alemania; Megazyme, Wicklow, Irlanda; Clariant, Muttentz, Suiza; Avecia, Manchester, Reino Unido y/o según los ejemplos contenidos en la presente memoria.

Se describen otros agentes matizantes adecuados con más detalle en el documento US-7.208.459 B2.

Encapsulados

En un aspecto del producto de consumo mencionado anteriormente, dicho producto de consumo puede comprender, basándose en el peso total del producto de consumo, de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 5 % en

- peso, de aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 2 % en peso o incluso de aproximadamente 0,03 % en peso a aproximadamente 0,5 % en peso de dicho encapsulado que comprende un perfume, dicho perfume encapsulado, en un aspecto, comprende una microcápsula de perfume. Los encapsulados adecuados comprenden de forma típica un núcleo y una envoltura que tiene una superficie interna y externa, recubriendo dicha envoltura a dicho núcleo. En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en perfumes; abrillantadores; tintes; repelentes de insectos; siliconas; ceras; agentes saborizantes; vitaminas; agentes suavizantes de tejidos; agentes para el cuidado de la piel, en un aspecto, parafinas; enzimas; agentes antibacterianos; blanqueadores; estimulantes sensoriales; y mezclas de los mismos; y dicha envoltura puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en polietilenos; poliamidas; poliestirenos; poliisoprenos; policarbonatos; poliésteres; poliacrilatos; aminoplastos, en un aspecto, dicho aminoplasto puede comprender poliureas, poliuretano, y/o poliureauretano, en un aspecto, dicha poliurea puede comprender polioximetilenurea y/o melamina formaldehído; poliolefinas; polisacáridos, en un aspecto dicho polisacárido puede comprender alginato y/o quitosana; gelatina; goma laca; resinas epoxi; polímeros de vinilo; compuestos inorgánico insolubles en agua; silicona; y mezclas de los mismos.
- En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender perfume.
- En un aspecto de dicho encapsulado, dicha envoltura puede comprender melamina formaldehído y/o melamina formaldehído reticulada.
- En un aspecto, los encapsulados adecuados pueden comprender un material de núcleo y una envoltura, rodeando dicha envoltura al menos parcialmente dicho material de núcleo, que se describe. Al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener una resistencia a la fractura de aproximadamente de 0,2 MPa a aproximadamente 10 MPa, de aproximadamente 0,4 MPa a aproximadamente 5 MPa, de aproximadamente 0,6 MPa a aproximadamente 3,5 MPa o incluso de aproximadamente 0,7 MPa a aproximadamente 3 MPa; y un escape de agente beneficioso de 0 % a aproximadamente 30 %, de 0 % a aproximadamente 20 %, o incluso de 0 % a aproximadamente 5 %.
- En un aspecto, al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener un tamaño de partículas de aproximadamente 1 micrómetros a aproximadamente 80 micrómetros, de aproximadamente 5 micrómetros a 60 micrómetros, de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 50 micrómetros, o incluso de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 40 micrómetros.
- En un aspecto, al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener un espesor de pared de la partícula de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 180 nm, o incluso de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 160 nm.
- En un aspecto, dicho material de núcleo de los encapsulados puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en una materia prima de perfume y/u opcionalmente un material seleccionado del grupo que consiste en aceite vegetal, que incluye aceites vegetales puros y/o mezclados incluidos aceite de ricino, aceite de coco, aceite de algodón, aceite de orujo de uva, colza, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de lino, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de coco, aceite de almendra de palma, aceite de ricino, aceite de limón y mezclas de los mismos; ésteres de aceites vegetales, ésteres, incluidos adipato de dibutilo, ftalato de dibutilo, benciladipato de butilo, octiladipato de bencilo, fosfato de tricresilo, fosfato de trioctilo y mezclas de los mismos; hidrocarburos de cadena lineal o ramificada, incluidos aquellos hidrocarburos de cadena lineal o ramificada que tienen un punto de ebullición superior a aproximadamente 80 °C; terfenilos parcialmente hidrogenados, ftalatos de dialquilo, alquilbifenilo, incluido monoisopropilbifenilo, naftaleno alquilado, incluido dipropilnaftaleno, sustancias volátiles procedentes del petróleo incluidos queroseno, aceite mineral y mezclas de los mismos; disolventes aromáticos, incluidos benceno, tolueno y mezclas de los mismos; aceites de silicona; y mezclas de los mismos.
- En un aspecto, dicho material de la pared de los encapsulados puede comprender una resina que incluye el producto de reacción de un aldehído y una amina, los aldehídos adecuados incluyen formaldehído. Las aminas adecuadas incluyen melamina, urea, benzoguanamina, glicolurilo, y mezclas de los mismos. Las melaminas adecuadas incluyen metilol melamina, metilol melamina metilada, iminomelamina y mezclas de los mismos. Las ureas adecuadas incluyen dimetilol urea, dimetilol urea metilada, urea-resorcinol, y mezclas de los mismos.
- En un aspecto, los eliminadores de formaldehído adecuados se pueden emplear con los encapsulados, por ejemplo, en una suspensión acuosa de cápsulas y/o se añaden al producto de consumo antes, durante o después de añadir los encapsulados a dicho producto de consumo.
- Las cápsulas adecuadas se pueden preparar siguiendo las enseñanzas de USPA 2008/0305982 A1; y/o de USPA 2009/0247449 A1. Alternativamente, las cápsulas adecuadas se pueden adquirir de Appleton Papers Inc. de Appleton, Wisconsin EE. UU.
- Además, los materiales para fabricar los encapsulados anteriormente mencionados se pueden obtener de Solutia Inc. (St Louis, Missouri EE. UU.), Cytec Industries (West Paterson, New Jersey EE. UU.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri EE. UU.), CP Kelco Corp. de San Diego, California, EE. UU.; BASF AG de Ludwigshafen, Alemania; Rhodia Corp. de Cranbury, Nueva Jersey, EE. UU.; Hercules Corp. de Wilmington, Delaware, EE. UU.;

Agrium Inc. de Calgary, Alberta, Canadá, ISP de New Jersey EE. UU., Akzo Nobel de Chicago, IL, EE. UU.; Stroeever Shellac Bremen de Bremen, Alemania; Dow Chemical Company de Midland, MI, EE. UU.; Bayer AG de Leverkusen, Alemania; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, EE. UU.

5 Método para preparar una variante de la proteasa precursora

En los ejemplos 31 a 43 se proporciona un conjunto no limitante de métodos para producir las proteasas.

Numeración de aminoácidos de proteasa, nomenclatura de enzimas y definiciones adicionales

10 La numeración de las posiciones de aminoácidos usada en esta patente es el sistema de numeración de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*. Cada posición de aminoácido de cada variante de proteasa, incluida cada variante de proteasa, está numerada según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Figura 1, que se determina por alineación de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Un esquema de numeración alternativo es numerar la secuencia de aminoácidos específica de la proteasa de la subtilisina GG36 de *B. lentus*, que tiene la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º:1. Ninguna de las posiciones de aminoácidos de las variantes de proteasa, incluidas las variantes de proteasa descritas en la presente memoria, se numeran usando este esquema de numeración alternativo.

En la descripción de las variantes de proteasa en la presente memoria, se usa la siguiente nomenclatura para facilitar la referencia: Aminoácido(s) original(es):posición (posiciones) del (de los) aminoácido(s) sustituido(s).

25 Las mutaciones se nombran mediante el código de una letra para el aminoácido parental, seguido de un número de posición de tres dígitos y a continuación, el código de una letra para la variante del aminoácido. Por ejemplo, la mutación de glicina (G) en la posición 87 a serina (S) se representa como "G087S" o "G87S". Las mutaciones múltiples se indican mediante la inserción de "-" entre las mutaciones. Las mutaciones en las posiciones 87 y 90 se representan como "G087S-A090Y" o "G87S-A90Y" o "G87S + A90Y" o "G087S + A090Y". Para las delecciones se usa el código de una sola letra "Z". Para una inserción con relación a la secuencia genitora, el código de una sola letra "Z" se encuentra a la izquierda del número de la posición. Para una delección, el código de una sola letra "Z" se encuentra a la derecha del número de la posición. Para inserciones, el número de la posición es el número de la posición antes del aminoácido o aminoácidos insertados, más 0,01 por cada aminoácido. Por ejemplo, una inserción de tres aminoácidos alanina (A), serina (S) y tirosina (Y) entre la posición 87 y la 88 se muestra como "Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y". Por lo tanto, la combinación de todas las mutaciones mencionadas anteriormente más una delección en la posición 100 es: "G087S- Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y-A090Y-A100Z".

En todos los casos, se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o en triplete aceptada por la IUPAC. La letra X sola se refiere a cualquiera de los 20 aminoácidos.

La expresión "de tipo silvestre", con referencia a una secuencia de aminoácidos o a una secuencia de ácidos nucleicos, indica que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia nativa o de origen natural. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "de origen natural" se refiere a cualquier elemento (p. ej., proteínas, aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos) que se encuentran en la naturaleza (es decir, no se han manipulado por medio de métodos recombinantes). Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "de origen no natural" se refiere a cualquier elemento que no se encuentra en la naturaleza (p. ej., ácidos nucleicos recombinantes producidos en el laboratorio).

50 Como se usa en la presente descripción con respecto a las posiciones de residuos de aminoácidos, "correspondiente a" o "corresponde a" o "corresponde" se refiere a un residuo de aminoácido en la posición enumerada en una proteína o péptido o un residuo de aminoácido que es análogo, homólogo o equivalente a un residuo enumerado en una proteína o péptido. En la presente memoria, "región correspondiente" se refiere, generalmente, a una posición análoga en una proteína relacionada o en una proteína de referencia.

55 Las expresiones "derivado de" y "obtenido a partir de" se refieren no solamente a una proteasa producida o que pueda producirse por medio de una cepa del organismo en cuestión, sino también, a una proteína codificada por una secuencia de ADN aislada a partir de dicha cepa y producida en un organismo hospedador que contiene dicha secuencia de ADN. Además, la expresión se refiere a una proteasa codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la proteasa en cuestión. Como ejemplo, "proteasas derivadas de *Bacillus*" se refiere a aquellas enzimas que tienen actividad proteolítica producidas de forma natural por *Bacillus*, además de serina proteasas como las producidas por fuentes de *Bacillus*, pero que a través del uso de técnicas de ingeniería genética son producidas por otros organismos no *Bacillus* transformados con un ácido nucleico que codifica las serina proteasas.

El término “idéntico” en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos se refiere a los restos en las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para obtener la correspondencia máxima, que se mide usando una de las siguientes comparaciones de secuencias o algoritmos de análisis.

5 En la presente memoria, “genes homólogos” se refiere a un par de genes de especies diferentes, pero por lo general relacionadas, que se corresponden entre sí y que son idénticas o muy similares entre sí. La expresión abarca genes que están separados por especiación (es decir, el desarrollo de nuevas especies) (p. ej., genes ortólogos), así como genes que han sido separados por duplicación genética (p. ej., genes parálogos).

10 El término forma “madura” de una proteína, polipéptido o péptido se refiere a la forma funcional de la proteína, polipéptido o péptido sin la secuencia del péptido señal y sin la secuencia del propéptido.

En la presente memoria, “homología” se refiere a similitud o identidad de secuencia, siendo preferida identidad. La homología se puede determinar usando técnicas estándar conocidas en la técnica (véase, p. ej., Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 [1970]; Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; programas informáticos tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux y col., Nucl. Acid Res. 12:387-395 [1984]). Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos por pares. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (véase Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 [1987]). El método es similar al descrito por Higgins y Sharp (véase Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153 [1989]). Los parámetros útiles de PILEUP incluyen una ponderación de hueco por defecto de 3,00, una ponderación por longitud de hueco por defecto de 0,10 y huecos terminales ponderados. Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul y col., (véase Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; y Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 [1993]). Un programa BLAST especialmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase, Altschul y col., Meth. Enzymol. 266:460-480 [1996]). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores por defecto. Los parámetros ajustables se ajustan con los valores siguientes: longitud de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y de la composición de la base de datos concreta contra la que se busca la secuencia de interés. Sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

El porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de referencia y una secuencia de prueba de interés se puede determinar fácilmente por el experto en la técnica. El porcentaje de identidad compartido por las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos se determina por comparación directa de la información de la secuencia entre las moléculas mediante alineación de las secuencias y determinación de la identidad por métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, (véase, Altschul, y col., J. Mol. Biol., 215:403-410 [1990]). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del centro nacional de información biotecnológica. Este algoritmo implica en primer lugar, identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. Estos aciertos de la palabra vecina iniciales actúan como puntos de partida para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabras se expanden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias que se comparan, para que se pueda aumentar en lo que respecta a la puntuación de alineación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa se reduce en una cantidad X desde un valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1992]) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M'5, N'-4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza entonces un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul, anteriormente citado). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a un ácido nucleico de la serina proteasa de esta divulgación si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con un ácido nucleico de la serina proteasa es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente, inferior a aproximadamente 0,01 y más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,001. Cuando el ácido nucleico de prueba codifica un polipéptido de serina proteasa, se considera similar a un ácido nucleico de la serina proteasa especificada si la comparación da lugar a una probabilidad de suma más pequeña de menos de aproximadamente 0,5 y más preferiblemente de menos de aproximadamente 0,2.

El porcentaje “idéntico” o de “identidad” en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de ácidos nucleicos o restos de aminoácidos, respectivamente, que son iguales, cuando se comparan y se alinean en busca de la máxima

similitud, como se determina usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. El “porcentaje de identidad de secuencia” o “% de identidad” o “% de identidad de secuencia” o “% de identidad de secuencia de aminoácidos” de una secuencia de aminoácidos objeto respecto de una secuencia de aminoácidos de referencia (es decir, de consulta), significa que la secuencia de aminoácidos objeto es idéntica (es decir, basándose en aminoácido por aminoácido) en un porcentaje especificado, a la secuencia de aminoácidos de consulta sobre una longitud de comparación, cuando se alinean las secuencias de manera óptima. Por lo tanto, 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos u 80 % de identidad con respecto a dos secuencias de aminoácidos, significa que el 80 % de los restos de aminoácidos de dos secuencias de aminoácidos alineadas de manera óptima son idénticos.

El “porcentaje de identidad de secuencia” o “% de identidad” o “% de identidad de secuencia” o “% de identidad de secuencia de nucleótidos” de una secuencia de ácidos nucleicos objeto respecto de una secuencia de ácidos nucleicos de referencia (es decir, de consulta), significa que la secuencia de ácidos nucleicos objeto es idéntica (es decir, basándose en nucleótido por nucleótido para una secuencia de polinucleótidos), en un porcentaje especificado, a la secuencia de consulta sobre una longitud de comparación, cuando se alinean las secuencias de manera óptima. Por lo tanto, 80 % de identidad de secuencia de nucleótidos u 80 % de identidad con respecto a dos secuencias de ácido nucleico, significa que el 80 % de los restos de nucleótidos en dos secuencias de ácido nucleico alineadas óptimamente son idénticos.

En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad de secuencia o “% de identidad de secuencia” o “% de identidad” de una secuencia objeto respecto de una secuencia de consulta se puede calcular mediante la alineación óptima de las dos secuencias y la comparación de las dos secuencias óptimamente alineadas sobre la longitud de comparación. Se determina el número de posiciones en la alineación óptima en la que se producen restos idénticos en ambas secuencias, proporcionando de este modo el número de posiciones coincidentes y después, se divide el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones de la longitud de comparación (que, a menos que se especifique otra cosa, es la longitud de la secuencia de consulta). El número resultante se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia en cuestión a la secuencia de consulta.

“Alineación óptima” u “óptimamente alineadas” se refiere a la alineación de dos (o más) secuencias que dan el mayor porcentaje de puntuación de identidad. Por ejemplo, el alineamiento óptimo de dos secuencias de proteínas se puede lograr mediante la alineación manual de las secuencias, de tal manera que se alinea entre sí el número máximo de restos de aminoácidos idénticos en cada secuencia o mediante el uso de programas o procedimientos de software descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de dos secuencias de ácidos nucleicos se puede lograr mediante la alineación manual de las secuencias, de tal manera que el número máximo de restos de nucleótidos idénticos en cada secuencia están alineados entre sí o mediante el uso de programas o procedimientos de software descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, dos secuencias de polipéptidos se consideran “óptimamente alineadas” cuando se alinean usando parámetros definidos, tales como una matriz de sustitución de aminoácidos definida, penalización por existencia de huecos (también denominado penalización por apertura de huecos) y penalización por extensión de huecos, a fin de lograr la mayor puntuación de similitud posible para ese par de secuencias. Con frecuencia, se usa la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, anteriormente citado) como matriz de sustitución de puntuación por defecto en los algoritmos de alineación de secuencias de polipéptidos (p. ej., BLASTP). La penalización por existencia de hueco se impone por la introducción de un único hueco para un aminoácido en una de las secuencias alineadas y la penalización por extensión de hueco se impone para cada posición de los restos en el hueco. Los parámetros de alineación ejemplares empleados son: matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por existencia de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1. La puntuación de alineación se define por las posiciones de los aminoácidos de cada secuencia en la que la alineación comienza y termina (p. ej., la ventana de alineación) y, opcionalmente, por la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias, a fin de lograr la puntuación de similitud más alta posible.

El alineamiento óptimo entre dos o más secuencias se puede determinar manualmente mediante inspección visual o mediante el uso de un ordenador, tal como, aunque no de forma limitativa por ejemplo, el programa BLASTP para secuencias de aminoácidos y el programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos (véase, p. ej., Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402 (1997); véase también, el sitio web del centro nacional de información biotecnológica (NCBI)).

Enzimas no inmunoequivalentes y/o enzimas adicionales

Los productos de consumo pueden comprender una o más enzimas que proporcionan beneficios en el rendimiento de limpieza y/o en el cuidado de tejidos. Los ejemplos de enzimas adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, hemicelulasas, peroxidasas, proteasas, celulasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas, pectinasas, mananasas, pectato liasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tannasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa, y amilasas, o mezclas de los mismos. Una combinación típica es un cóctel enzimático que puede comprender, por ejemplo, una proteasa y lipasa en conjunción con amilasa. Cuando están presentes en un producto de consumo, las enzimas adicionales antes mencionadas, pueden estar presentes a niveles de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente

2 %, de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 1 % o incluso de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,5 % de la proteína enzimática por peso del producto de consumo.

En un aspecto, las enzimas adecuadas incluirían una proteasa. Las proteasas adecuadas incluyen metaloproteasas y serina proteasas, incluidas serina proteasas neutras o alcalinas, tales como subtilisinas (EC 3.4.21.62). Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. En un aspecto, dicha proteasa adecuada puede ser de origen microbiano. Las proteasas adecuadas incluyen mutantes modificados química o genéticamente de las proteasas adecuadas anteriormente mencionadas. En un aspecto, la proteasa adecuada puede ser una serina proteasa, tal como una proteasa alcalina microbiana o/y una proteasa de tipo tripsina. Los ejemplos de proteasas neutras o alcalinas adecuadas incluyen:

(a) subtilisinas (EC 3.4.21.62), incluidas las derivadas de *Bacillus* tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* y *B. gibsonii* descritas en los documentos US 6.312.936 B1, US 5.679.630, US 4.760.025, US 7.262.042 y WO09/021867.

(b) proteasas similares a tripsina o quimiotripsina, tales como tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino), incluida la proteasa de *Fusarium* descrita en el documento US-5288627 y las quimiotripsina proteasas derivadas de *Cellulomonas* descritas en la patente US-2008/0063774A1.

(c) metaloproteasas, incluidas las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* descritas en la patente US-2008/0293610A1.

Las proteasas adecuadas incluyen las derivadas de *Bacillus gibsonii* o *Bacillus Lentus*.

Las enzimas proteasas adecuadas comerciales incluyen las que se venden con los nombres comerciales Alcalase®, Savinase®, Primase®, Durazym®, Polarzyme®, Kannase®, Liquease®, Liquease Ultra®, Savinase Ultra®, Ovozyme®, Neutrase®, Everlase® y Esperase® por Novozymes A/S (Dinamarca), las que se venden con el nombre comercial Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Properase®, Purafect®, Purafect Prime®, Purafect Ox®, FN3®, FN4®, Excellase® y Purafect OXP® por Genencor International, las que se venden con el nombre comercial Opticlean® y Optimase® por Solvay Enzymes, las comercializadas por Henkel/ Kemira, especialmente BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 de US-5.352.604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, denominada a continuación como BLAP), BLAP R (BLAP con S3T + V4I + V199M + V205I + L217D), BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I) y BLAP F49 (BLAP con S3T + V4I + A194P + V199M + V205I + L217D) - todas de Henkel/Kemira; y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus* con mutaciones A230V + S256G + S259N) de Kao.

En un aspecto, el producto de consumo puede comprender una proteasa que no es inmunoequivalente a la proteasa de esta invención. Para los fines de esta descripción, una proteasa inmunoequivalente tendrá un alto grado de identidad (> 80 %) con BPN' y presentará reacción cruzada con el mismo anticuerpo. Las enzimas no inmunoequivalentes adecuadas incluirán las derivadas de *Bacillus lentus*, *Bacillus gibsonii* y la metaloproteasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Las alfa-amilasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados química o genéticamente (variantes). Una alfa-amilasa alcalina adecuada puede derivarse de una cepa de *Bacillus*, tal como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* u otras *Bacillus* sp. tales como *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513, DSM 9375 (USP 7.153.818) DSM 12368, DSMZ n.º 12649, KSM AP1378 (US-6.979.731), KSM K36 o KSM K38 (US-6.916.645). Las amilasas adecuadas incluyen:

(a) las variantes descritas en los documentos WO 94/02597, US-6.297.037, US-7.378.264 y US-5.763.385, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones en comparación con la enzima nombrada como id. de sec. n.º 2 en el documento US-7.378.264: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

(b) las variantes descritas en los documentos USP 5.856.164 y US-6.673.589, US-6.093.562, US-6.187.576 y la patente US-2008/0193999A1, especialmente las variantes con una o más sustituciones en las siguientes posiciones en comparación con la enzima AA560 nombrada como Id. de sec. n.º:12 en el documento US PA 2008/0193999A1:

26, 30, 33, 82, 37, 106, 118, 128, 133, 149, 150, 160, 178, 182, 186, 193, 203, 214, 231, 256, 257, 258, 269, 270, 272, 283, 295, 296, 298, 299, 303, 304, 305, 311, 314, 315, 318, 319, 339, 345, 361, 378, 383, 419, 421, 437, 441, 444, 445, 446, 447, 450, 461, 471, 482, 484, preferiblemente que contienen también las delecciones de D183* y G184*.

(c) variantes que presentan al menos un 90 % de identidad con la id. de sec. n.º:4 en la patente US-2008/0193999A1, la enzima de tipo natural procedente de *Bacillus* sp.722, especialmente variantes con delecciones en las posiciones 183 y 184 y las variantes descritas en el documento US-6.187.576

(d) las variantes que muestran al menos 95 % de identidad con la enzima de tipo silvestre procedente de *Bacillus* sp.707 (Id. de sec. n.º: 7 en el documento US-6.093.562), especialmente las que comprenden una o más de las siguientes mutaciones M202, M208, S255, R172, y/o M261. En un aspecto, dicha amilasa comprende una o más de

M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q, M202W, S255N y/o R172Q. Son especialmente adecuadas aquellas que comprenden las mutaciones M202L o M202T.

Las alfa-amilasas adecuadas comerciales incluyen DURAMYL®, LIQUEZYME®, TERMAMYL®, TERMAMYL ULTRA®, NATALASE®, SUPRAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, FUNGAMYL® y BAN® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), KEMZYM® AT 9000 Biozym Biotech Trading GmbH Wehlstrasse 27b A-1200 Viena Austria, RAPIDASE®, PURASTAR®, ENZYSE® HT PLUS® y PURASTAR OXAM® (Genencor International Inc., Palo Alto, California) y KAM® (Kao, 14-10 Nihonbashi Kayabacho, 1-chome, Chuo-ku Tokyo 103-8210, Japón). En un aspecto, las amilasas adecuadas incluyen NATALASE®, STAINZYME® y STAINZYME PLUS® y mezclas de las mismas.

En un aspecto, dicha enzima adicional se puede seleccionar del grupo que consiste en: lipasas, incluidas "lipasas de primer ciclo", tales como las descritas en las patentes US-6.939.702 B1 y US-2009/0217464. En un aspecto, la lipasa es una lipasa de primer lavado, en un aspecto, una variante de la lipasa de tipo silvestre procedente de *Thermocycles lanuginosus* que comprende las mutaciones T231R y N233R. La secuencia natural tiene los 269 aminoácidos (aminoácidos 23 – 291) del número de registro Swissprot Swiss-Prot O59952 (derivada de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*)). Lipasas adecuadas incluirían las comercializadas con los nombres comerciales Lipex®, Lipolex® y Lipoclean® de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.

En un aspecto, la composición comprende una variante de la lipasa de *Thermocycles lanuginosa* que tiene > 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre y que comprende una sustitución o sustituciones en T231 y/o N233, en un aspecto, T231R y N233R.

En un aspecto, otras enzimas incluyen celulasas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* divulgadas en los documentos US-4.435.307, US-5.648.263, US-5.691.178, US-5.776.757 y US-5.691.178. Las celulasas adecuadas incluyen las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color. Los ejemplos de dichas celulasas son las celulasas descritas en los documentos US-5.520.838, US-5.948.672, US-5.919.691, US-6.001.639 y WO 98/08940. Otros ejemplos son las variantes de celulasa, tales como las descritas en los documentos US-6.114.296, US-5.457.046, US-5.457.046, US-5.686.593, US-5.763.254, US-6.117.664, US PA 2009/0170747A1 y PCT/DK98/00299. Las celulasas disponibles en el mercado incluyen CELLUZYME®, y CAREZYME® (Novozymes A/S), CLAZINASE®, y PURADAX HA® (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)® (Kao Corporation).

En un aspecto, la celulasa puede ser una celulasa bacteriana de limpieza. Dichas celulasas bacterianas de limpieza son endo beta 1,4-glucanasas y tienen una estructura que no comprende un módulo de unión a carbohidrato de clase A (MUC). Una MUC de clase A se define de acuerdo con A. B Boraston y col. *Biochemical Journal* 2004, Volumen 382 (parte 3), páginas 769-781. En particular, la celulasa no comprende una CBM de clase A procedente de las familias 1, 2a, 3, 5 y 10.

En un aspecto, la celulasa bacteriana de limpieza puede ser una glicosil hidrolasa que tiene actividad enzimática hacia sustratos de celulosa amorfa, en donde la glicosil hidrolasa se selecciona de familias 5, 7, 12, 16, 44 o 74 de GH. En un aspecto, la celulasa puede ser una glicosil hidrolasa seleccionada de la familia 5 de GH. En un aspecto, la celulasa puede ser Celluclean®, suministrada por Novozymes. Esta celulasa se describe con más detalle en el documento US-7.141.403. La definición de la familia de la glicosil hidrolasa (GH) se ha descrito con más detalle en *Biochem J.* 1991, v280, 309-316.

Otra celulasa bacteriana de limpieza adecuada es una glicosil hidrolasa que tiene actividad enzimática hacia sustratos tanto de xiloglucano como de celulosa amorfa, en donde la glicosil hidrolasa se selecciona de familias 5, 12, 44 o 74 de GH. En un aspecto, la glicosil hidrolasa se selecciona de la familia 44 de GH. La enzima glicosil hidrolasa puede pertenecer a la familia de la glicosil hidrolasa 44.

Las glicosil hidrolasas adecuadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en: glicosil hidrolasas de la familia 44 de GH de *Paenibacillus polyxyma* (natural), tal como, XYG1006 descrita en el documento US-7.361.736 o son variantes de la misma; glicosil hidrolasas de la familia 12 de *Bacillus licheniformis* (natural) como, por ejemplo, Sec. n.º Id.: 1 descritas en el documento US-6.268.197 o son variantes de la misma; glicosil hidrolasas de la familia 5 de *Bacillus agaradhaerens* (natural) o variantes de las mismas; glicosil hidrolasas de la familia 5 de GH de *Paenibacillus* (de tipo silvestre) tal como, XYG1034 y XYG 1022 descritas en el documento US-6.630.340 o variantes de las mismas; glicosil hidrolasas de la familia 74 de GH de *Paenibacillus polyxyma* (de tipo silvestre) tal como, XYG1020 descrita en el documento WO 2002/077242 o variantes de la misma; y glicosil hidrolasas de la familia 74 de GH de *Trichoderma Reesei* (de tipo silvestre) tal como la enzima descrita con más detalle en el identificador de secuencia número 2 del documento US-7.172.891 o variantes de la misma.

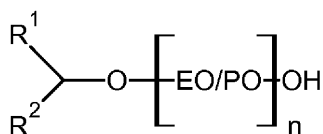
Las glicosil hidrolasas adecuadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en: glicosil hidrolasas de la familia 44 de GH de *Paenibacillus polyxyma* (natural) tal como, XYG1006 o son variantes de la misma.

Las celulasas bacterianas de limpieza se comercializan bajo los nombres comerciales Celluclean® y Whitezyme® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).

En un aspecto, la composición puede comprender una celulasa fúngica de limpieza que pertenece a la familia glicosil hidrolasa 45 que tiene un peso molecular de 17 kDa a 30 kDa, por ejemplo, las endoglucanasas comercializadas bajo el nombre comercial Biotouch® NCD, DCC y DCL (AB Enzymes, Darmstadt, Alemania).

Otras enzimas adecuadas incluyen las pectato liasas comercializadas bajo los nombres comerciales Pectawash®, Pectaway® y las mananasas comercializadas bajo los nombres comerciales Mannaway® (todas de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) y Purabrite® (Genencor International Inc., Palo Alto, California).

En un aspecto, la composición comprende un tensioactivo no iónico de Guerbet. El tensioactivo no iónico de Guerbet es un tensioactivo detergente a base de alcohol secundario que tiene la fórmula:



en donde R^1 = alquilo C_{2-8} lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado;

en donde R^2 = alquilo C_{2-8} lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado,

en donde el número total de átomos de carbono presente en los restos $R^1 + R^2$ está en el intervalo de 7 a 13; en donde OE/OP son restos alcoxi seleccionados de etoxi, propoxi o mezclas de los mismos;

en donde n es el grado medio de alcoxilación y está en el intervalo de 4 a 10.

Aditivos reforzantes de la detergencia

Los detergentes para lavado de ropa comerciales comprenden un aditivo reforzante de la detergencia inorgánico fuerte, tanto con agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato, de forma típica tripolifosfato sódico (STPP), o con zeolita, de forma típica agentes reforzantes de la detergencia de tipo aluminosilicato sódico, usado como aditivo reforzante de la detergencia fuerte predominante. Generalmente, dichos aditivos reforzantes de la detergencia fuertes están presentes a niveles relativamente altos como, por ejemplo, de 15 % a 20 % en peso o incluso superiores, por ejemplo, hasta 40 % en peso. De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, la cantidad de aditivo reforzante de la detergencia fuerte seleccionado de un aditivo reforzante de la detergencia de tipo fosfato y/o de tipo zeolita no es superior a 10 % en peso, con respecto al peso total de la composición detergente, preferiblemente inferior a 8 % en peso, o incluso más preferiblemente inferior a 5 o 4 o 3 o 2 o 1 % en peso.

Por lo tanto, composiciones preferidas de la invención son composiciones bajas en aditivos reforzantes de la detergencia que comprenden de 0 % en peso a 10 % en peso de agente reforzante de la detergencia de tipo zeolita y de 0 % en peso a 10 % en peso de agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato, no siendo la cantidad total de fosfato y/o de zeolita superior a 10 % en peso y, preferiblemente, inferior a 10 % en peso, según se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, las composiciones de la invención comprenden de 0 % en peso a 8 % en peso o de 0 % en peso a 5 % o 4 % en peso o de 0 % en peso a 3 % o incluso menos de 2 % en peso de aditivo reforzante de la detergencia de tipo zeolita. Puede preferirse incluso que la composición esté prácticamente exenta de aditivo reforzante de la detergencia de tipo zeolita. Por “prácticamente exenta” de agente reforzante de la detergencia de tipo zeolita quiere decirse, de forma típica, que la composición no comprende agente reforzante de la detergencia de tipo zeolita añadido deliberadamente. Esto se prefiere especialmente cuando es deseable que la composición sea muy soluble, para minimizar la cantidad de residuos insolubles en agua (por ejemplo, que pueden depositarse sobre las superficies de los tejidos), y también cuando resulta muy deseable tener una solución de lavado transparente. Los agentes reforzantes de la detergencia de tipo zeolita incluyen zeolita A, zeolita X, zeolita P y zeolita MAP.

Las composiciones de la invención pueden comprender de 0 % en peso a 10 % en peso de agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato. La composición comprende preferiblemente de 0 % en peso a 8 % en peso o de 0 % en peso a 5 % o 4 % en peso o de 0 % en peso a 3 % o incluso 2 % en peso de agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato. Puede preferirse incluso que la composición esté prácticamente exenta de aditivo reforzante de la detergencia de tipo fosfato. Por “prácticamente exenta” de agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato quiere decirse, de forma típica, que la composición no comprende aditivo reforzante de la detergencia de tipo fosfato añadido deliberadamente. Esto resulta especialmente preferido cuando es deseable que la composición tenga un perfil medioambiental muy bueno. Los agentes reforzantes de la detergencia de tipo fosfato incluyen tripolifosfato sódico.

En otro aspecto preferido de la invención, el nivel total de aditivos reforzantes de la detergencia débiles, seleccionados de silicato laminar (SKS-6), ácido cítrico, sales citrato y ácido nitrilotriacético o sal del mismo es

inferior a 15 % en peso, más preferiblemente inferior a 8 % en peso, más preferiblemente inferior a 4 % en peso o incluso inferior a 3 o 2 % en peso con respecto al peso total de la composición detergente. De forma típica, el nivel de cada silicato laminar, ácido cítrico, sales citrato y ácido nitrilotriacético o sal del mismo será inferior a 10 % en peso o incluso inferior a 5 % en peso o a un % en peso con respecto al peso total de la composición.

Aunque los aditivos reforzantes de la detergencia proporcionan diversas ventajas al formulador, su principal papel es secuestrar iones de metal divalentes (como, por ejemplo, iones calcio y magnesio) de la solución de lavado que interactuarían si no de forma negativa con el sistema tensioactivo. Los aditivos reforzantes de la detergencia son también eficaces en la eliminación de iones de metal y suciedad inorgánica de la superficie del tejido, proporcionando una mejor retirada de manchas ocasionadas por sólidos en forma de partículas y manchas ocasionadas por bebidas. Cabría esperar, por lo tanto, que la reducción de sus niveles tenga un impacto negativo en la capacidad limpiadora y, por lo tanto, la preparación de composiciones detergentes eficaces con los niveles reducidos reivindicados de agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato y zeolita es sorprendente.

Alcalinidad de reserva

En la presente memoria, la expresión “alcalinidad de reserva” es una medida de la capacidad tamponadora de la composición detergente (g/NaOH/100 g de composición detergente) determinada valorando una solución 1 % (peso/volumen) de composición detergente con ácido clorhídrico a pH 7,5, es decir, para calcular la alcalinidad de reserva según se define a continuación:

$$\text{Alcalinidad de reserva (a pH 7,5) como \% de álcali en g NaOH/100 g de producto} = \frac{T \times M \times 40 \times \text{Vol}}{10 \times Wt \times \text{Aliquot}}$$

T	=	valoración (ml) a pH 7,5
M	=	Molaridad de HCl = 0,2
40	=	Peso molecular de NaOH
Vol	=	Volumen total (es decir, 1000 ml)
W	=	Peso de producto (10 g)
Alícuota	=	(100 ml)

Obtener una muestra de 10 g pesada con una exactitud de dos decimales, de composición detergente totalmente formulada. La muestra debería obtenerse usando un muestreador Pascall en un compartimento estanco al polvo. Añadir la muestra de 10 g a un vaso de precipitados de plástico y añadir 200 ml de agua desionizada exenta de dióxido de carbono. Agitar usando un agitador magnético sobre una placa de agitación a 150 rpm hasta que se disuelva completamente y durante, al menos, 15 minutos. Transferir el contenido del vaso de precipitados a un matraz aforado de 1 litro y enrasar a 1 litro con agua desionizada. Mezclar bien y tomar inmediatamente una alícuota de 100 ml $\pm$ 1 ml usando una pipeta de 100 ml. Medir y registrar el pH y la temperatura de la muestra usando un pH-metro capaz de leer a $\pm$ 0,01 unidades de pH, con agitación, asegurándose de que la temperatura sea de 21 °C $\pm$ 2 °C. Valorar volumétricamente mientras se agita con ácido clorhídrico 0,2 M hasta que el pH sea exactamente de 7,5. Anotar los mililitros de ácido clorhídrico usados. Tomar el título promedio de tres repeticiones idénticas. Realizar los cálculos anteriormente descritos para calcular RA a pH 7,5.

La RA de las composiciones detergentes de la invención puede ser preferiblemente superior a 7,5 y, preferiblemente, superior a 8. La RA puede ser superior a 9 o incluso superior a 9,5 ó 10, o superior. La RA puede ser de hasta 20 o superior.

Puede proporcionarse una reserva adecuada de alcalinidad, por ejemplo, mediante uno o más de los silicatos de metal alcalino (excluyendo el silicato laminar cristalino), de forma típica sales silicatos amorfas, generalmente sales sódicas en una relación de 1,2 a 2,2 de metal alcalino de forma típica carbonato, bicarbonato y/o sesquicarbonatos sódicos. Los STPP y las persales como, por ejemplo, los perboratos y los percarbonatos también contribuyen a la alcalinidad. Es necesario un tamponador para mantener un pH alcalino durante el proceso de lavado que contrarreste la acidez de la suciedad, especialmente los ácidos grasos liberados por la enzima lipasa.

La composición detergente preferiblemente comprende de 0 % en peso a 50 % en peso de sal silicato, de forma más habitual de 5 % a 30 % en peso de sal silicato, o de 7 % a 20 % en peso de sal silicato, de forma habitual silicato sódico.

Para proporcionar la alcalinidad de reserva preferida, las composiciones detergentes de la invención pueden comprender una sal de carbonato, de forma típica de 1 % en peso a 70 % en peso o de 5 % en peso a 50 % en peso o de 10 % en peso a 30 % en peso de sal de carbonato. Las sales carbonato preferidas son carbonato sódico y/o bicarbonato sódico y/o sesquicarbonato sódico. La sal carbonato puede incorporarse a la composición detergente completa o parcialmente mediante sal mezclada como, por ejemplo, Burkeita. Una sal de carbonato muy preferida es carbonato sódico. Preferiblemente, la composición puede comprender de 5 % en peso a 50 % en peso de carbonato sódico, o de 10 % a

40 % en peso o incluso de 15 % a 35 % en peso de carbonato sódico. Puede desearse también que la composición comprenda de 1 % en peso a 20 % en peso de bicarbonato sódico, o incluso de 2 % a 10 % u 8 % en peso.

- 5 Si está presente la zeolita, puede desearse que la relación en peso de carbonato sódico y/o silicato sódico a aditivo reforzante de la detergencia de tipo zeolita sea, al menos, 5:1, preferiblemente al menos 10:1 o, al menos 15:1 o, al menos 20:1 o incluso al menos 25:1

- 10 La sal de carbonato, o al menos parte de la misma, está de forma típica en forma de partículas, que tienen de forma típica un tamaño medio de partícula ponderado en el intervalo de 200 a 500 micrómetros. No obstante, puede ser preferente que la sal de carbonato, o al menos parte de la misma, esté en forma de partículas micronizadas, que tienen de forma típica un tamaño de partículas promedio en el intervalo de 4 a 40 micrómetros; esto resulta especialmente preferido cuando la sal de carbonato, o al menos parte de la misma, está en forma de mezcla de copartículas con un tensioactivo detergente, tal como un tensioactivo detergente aniónico alcoxilado.

- 15 Para proporcionar la alcalinidad de reserva requerida, preferiblemente los niveles de sales carbonato y/o silicato, de forma típica carbonato sódico y silicato sódico serán de 10 % a 70 % en peso, o de 10 % o incluso 15 % a 50 % en peso con respecto al peso total de la composición.

20 Materiales adyuvantes

- Además de los materiales previamente divulgados en la presente memoria y aunque no son esenciales para los fines de la presente invención, los adyuvantes de la lista no limitativa que se ilustra a continuación son adecuados para su uso en los presentes productos de consumo y pueden incorporarse deseablemente en determinadas realizaciones de la invención, por ejemplo, para ayudar o mejorar la capacidad limpiadora, para tratar el sustrato que se desea limpiar o para modificar la estética del producto de consumo, como en el caso de perfumes, colorantes, tintes o similares. Los niveles de cualquiera de dichos adyuvantes incorporados en cualquier producto de consumo son, además, cualquiera de los materiales citados anteriormente para su incorporación. La naturaleza exacta de estos componentes/adyuvantes adicionales y los niveles de incorporación de los mismos dependerán de la forma física del producto de consumo y de la naturaleza de la operación de limpieza para la cual se usan. Los materiales adyuvantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, agentes quelantes, agentes inhibidores de la transferencia de colorantes, dispersantes, enzimas adicionales, y estabilizadores de enzimas, materiales catalíticos, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos formados previamente, agentes dispersantes poliméricos, inhibidores de redeposición/eliminación de manchas de arcilla, abrillantadores, supresores de las jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastizantes de la estructura, suavizantes de tejidos, vehículos, hidrótrofos, mejoradores del proceso, disolventes y/o pigmentos. Además de la descripción siguiente, ejemplos adecuados de otros adyuvantes de este tipo y niveles de uso se encuentran en US-5.576.282, US-6.306.812 B1 y US-6.326.348 B1.

- 40 Como se ha indicado, los ingredientes adyuvantes no son esenciales para los productos de consumo de los solicitantes. Por lo tanto, determinadas realizaciones de los productos de consumo de los solicitantes no contienen uno o más de los siguientes materiales adyuvantes: tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, agentes quelantes, agentes inhibidores de la transferencia de colorantes, dispersantes, enzimas adicionales, y estabilizadores de enzimas, materiales catalíticos, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos formados previamente, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación/inhibidores de redeposición de manchas de arcilla, abrillantadores, supresores de las jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastizantes de la estructura, suavizantes de tejidos, vehículos, hidrótrofos, adyuvantes de procesamiento, disolventes y/o pigmentos. Sin embargo, cuando uno o más adyuvantes están presentes, este uno o más adyuvantes pueden estar presentes como se describe a continuación:

- 50 Agentes blanqueantes: los productos de consumo de la presente invención pueden comprender uno o más agentes blanqueantes. Los agentes blanqueantes adecuados que no sean catalizadores del blanqueador incluyen, fotoblanqueadores, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados y mezclas de los mismos. En general, cuando se usa un agente blanqueante, los productos de consumo de la presente invención pueden comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 % de agente blanqueante en peso del producto de consumo de la invención. Ejemplos de agentes blanqueantes adecuados incluyen:

- 55 (1) fotoblanqueantes, por ejemplo, ftalocianina de cinc sulfonada, ftalocianinas de aluminio sulfonada, tintes de xanteno y mezclas de los mismos;

- 60 (2) perácidos formados previamente: Los perácidos formados previamente adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, compuestos seleccionados del grupo que consiste en sales y ácidos percarboxílicos, sales y ácidos percarbónicos, sales y ácidos perimídicos, sales y ácidos peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone®, y mezclas de los mismos. Ácidos percarboxílicos adecuados incluyen perácidos hidrófobos e hidrófilos que tienen la fórmula R-(C=O)O-O-M, en la que R es un grupo alquilo, de forma opcional ramificado, que tiene, si el perácido es hidrófobo, de 6 a 14 átomos de carbono, o de 8 a 12 átomos de carbono y, si el perácido es hidrófilo, menos de 6 átomos de carbono o incluso menos de 4 átomos de carbono; y M es un contraión, por ejemplo, sodio, potasio o hidrógeno;

(3) Fuentes de peróxido de hidrógeno, por ejemplo, sales inorgánicas perhidratadas, incluidas sales de metal alcalino tales como sales sódicas de perborato (habitualmente monohidratado o tetrahidratado), sales percarbonato, persulfato, perfosfato, persilicato y mezclas de las mismas. En un aspecto de la invención, las sales inorgánicas perhidratadas se seleccionan del grupo que consiste en sales sódicas de perborato, percarbonato y mezclas de las mismas. Cuando se emplean, las sales inorgánicas perhidratadas están de forma típica presentes en cantidades de 0,05 a 40 % en peso o de 1 a 30 % en peso del producto de consumo global y se incorporan de forma típica a estas composiciones como un sólido cristalino que puede ser recubierto. Los recubrimientos adecuados incluyen sales inorgánicas tales como silicato de metal alcalino, sales carbonato o borato o mezclas de las mismas o materiales orgánicos tales como polímeros, ceras, aceites o jabones grasos solubles o dispersables en agua; y

(4) activadores del blanqueador que tienen R-(C=O)-L en donde R es un grupo alquilo, de forma opcional ramificado, que tiene, cuando el activador del blanqueador es hidrófobo, de 6 a 14 átomos de carbono, o de 8 a 12 átomos de carbono y, cuando el activador del blanqueador es hidrófilo, menos de 6 átomos de carbono o incluso menos de 4 átomos de carbono; y L es un grupo saliente. Ejemplos de grupos salientes adecuados son ácido benzoico y derivados del mismo - especialmente bencenosulfonato. Los activadores del blanqueador adecuados incluyen dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoiloxibenzoico o sales del mismo, 3,5,5-trimetilhexanoiloxibenceno sulfonato, tetraacetil etilendiamina (TAED) y nonanoiloxibenceno sulfonato (NOBS). También se divulgan activadores del blanqueador adecuados en el documento US-6.380.144. Aunque puede emplearse cualquier activador del blanqueador adecuado, en un aspecto de la invención, el producto de consumo en cuestión puede comprender NOBS, TAED o mezclas de los mismos.

Si está presente, el perácido y/o el activador del blanqueador está generalmente presente en el producto de consumo en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60 % en peso, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40 % en peso o incluso de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 % en peso, con respecto al producto de consumo. Pueden utilizarse uno o más perácidos hidrófobos o precursores de los mismos junto con uno o más perácidos hidrófilos o precursores de los mismos.

Las cantidades de fuente de peróxido de hidrógeno y perácido o activador del blanqueador pueden ser seleccionadas de manera que la relación molar del oxígeno disponible (de la fuente de peróxido) a perácido sea de 1:1 a 35:1 o incluso de 2:1 a 10:1.

Tensioactivos - Los productos de consumo según la presente invención pueden comprender un tensioactivo o sistema tensioactivo en donde el tensioactivo puede seleccionarse de tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfóteros, tensioactivos de ion híbrido, tensioactivos no iónicos semipolares y mezclas de los mismos. Si está presente, el tensioactivo está presente de forma típica a un nivel de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 % o incluso de aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 % en peso del producto de consumo de la invención.

Los tensioactivos deteritivos aniónicos adecuados incluyen tensioactivos deteritivos de tipo sulfato y sulfonato.

Los tensioactivos deteritivos de tipo sulfonato adecuados incluyen, alquilbenceno sulfonato, en un aspecto, alquil C₁₀₋₁₃ benceno sulfonato. Se puede obtener alquilbenceno sulfonato (LAS) adecuado, sulfonando alquilbenceno lineal (LAB) comercial; los LAB adecuados incluyen LAB con bajo contenido en 2-fenilo, tales como los suministrados por Sasol bajo el nombre comercial Isochem® o los suministrados por Petresa bajo el nombre comercial Petrelab®, otros LAB adecuados incluyen LAB con alto contenido en 2-fenilo, tales como los suministrados por Sasol bajo el nombre comercial Hyblene®. Un tensioactivo deteritivo aniónico es un alquilbenceno sulfonato que se obtiene mediante el proceso catalizado DETAL, aunque también pueden ser adecuadas otras rutas sintéticas, como HF.

Los tensioactivos deteritivos de tipo sulfato adecuados incluyen alquilsulfato, en un aspecto, alquil C₈₋₁₈ sulfato o predominantemente alquil C₁₂ sulfato.

Otro tensioactivo deteritivo de tipo sulfato adecuado es el alquilsulfato alcoxilado, en un aspecto, alquilsulfato etoxilado, en un aspecto, un alquil C₈₋₁₈ sulfato alcoxilado, en otro aspecto, un alquil C₈₋₁₈ sulfato etoxilado, de forma típica el alquilsulfato alcoxilado tiene un grado promedio de alcoxilación de 0,5 a 20 o de 0,5 a 10, de forma típica el alquilsulfato alcoxilado es un alquil C₈₋₁₈ sulfato etoxilado que tiene un grado promedio de etoxilación de 0,5 a 10, de 0,5 a 7, de 0,5 a 5 o incluso de 0,5 a 3.

El alquilsulfato, el sulfato alquil alcoxilado y los alquilbenceno sulfonatos pueden ser lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos.

El tensioactivo deteritivo puede ser un tensioactivo deteritivo ramificado de cadena media, en un aspecto, un tensioactivo deteritivo aniónico ramificado de cadena media, en un aspecto, un sulfato de alquilo ramificado de cadena media y/o un alquilbenceno sulfonato ramificado de cadena media, por ejemplo, un sulfato de alquilo ramificado de cadena media. En un aspecto, las ramificaciones de cadena media son grupos alquilo C₁₋₄, de forma típica, grupos metilo y/o etilo.

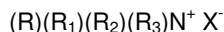
Los tensioactivos deteritivos no iónicos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en: alquiletoxilatos C₈-C₁₈, tales como tensioactivos no iónicos NEODOL® de Shell; alcoxilatos de alquilfenol C₆-C₁₂ en donde las unidades alcoxilato pueden ser unidades etilenoxi, unidades propilenoxi o una mezcla de las mismas; productos de condensación de alcohol C₁₂-C₁₈ y alquilfenol C₆-C₁₂ con polímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno tales como, por ejemplo, Pluronic® de BASF; alcoholes de cadena intermedia ramificada C₁₄-C₂₂; alcoxilatos de alquilo C₁₄-C₂₂ de cadena media ramificada, que tengan de forma típica un grado de alcoxilación promedio de 1 a 30; alquilpolisacáridos, en un aspecto, alquilpoliglucósidos; polihidroxiamidas de ácido graso; tensioactivos de alcohol poli(oxialquilado) terminalmente protegido con éter; y mezclas de los mismos.

Los tensioactivos deteritivos no iónicos adecuados incluyen alquilpoliglucósido y/o un alcohol alcoxlado de alquilo.

En un aspecto, los tensioactivos deteritivos no iónicos incluyen alcoholes alcoxlados de alquilo, en un aspecto, alcohol alcoxlado de alquilo C₈₋₁₈, por ejemplo, un alcohol etoxilado de alquilo C₈₋₁₈, el alcohol alcoxlado de alquilo puede tener un grado promedio de alcoxilación de 1 a 50, de 1 a 30, de 1 a 20 o de 1 a 10. En un aspecto, el alcohol alcoxlado de alquilo puede ser un alcohol etoxilado de alquilo C₈₋₁₈ que tenga un grado promedio de etoxilación de 1 a 10, de 1 a 7, más de 1 a 5 o de 3 a 7. El alcohol alcoxlado de alquilo puede ser lineal o ramificado y sustituido o no sustituido.

Los tensioactivos deteritivos catiónicos adecuados incluyen compuestos de alquilpiridinio, compuestos de alquilamonio cuaternario, compuestos de alquilfosfonio cuaternario, compuestos de alquilsulfonio ternario y mezclas de los mismos.

Los tensioactivos deteritivos catiónicos adecuados son compuestos de amonio cuaternario que tienen la fórmula general:



en donde R es un resto alquilo o alqueno C₆₋₁₈ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de restos metilo o etilo, R₃ es un resto hidroxilo, hidroximetilo o hidroxietilo, X es un anión que proporciona neutralidad de carga, los aniones adecuados incluyen: haluros, por ejemplo, cloruro; sulfato; y sulfonato. Los tensioactivos deteritivos catiónicos adecuados son cloruros de mono-alquil C₆₋₁₈ mono-hidroxietil dimetilamonio cuaternario. Los tensioactivos deteritivos catiónicos muy adecuados son cloruro de mono-alquil C₈₋₁₀ mono-hidroxietil dimetilamonio cuaternario, cloruro de mono-alquil C₁₀₋₁₂ mono-hidroxietil dimetilamonio cuaternario y cloruro de mono-alquil C₁₀ mono-hidroxietil dimetilamonio cuaternario.

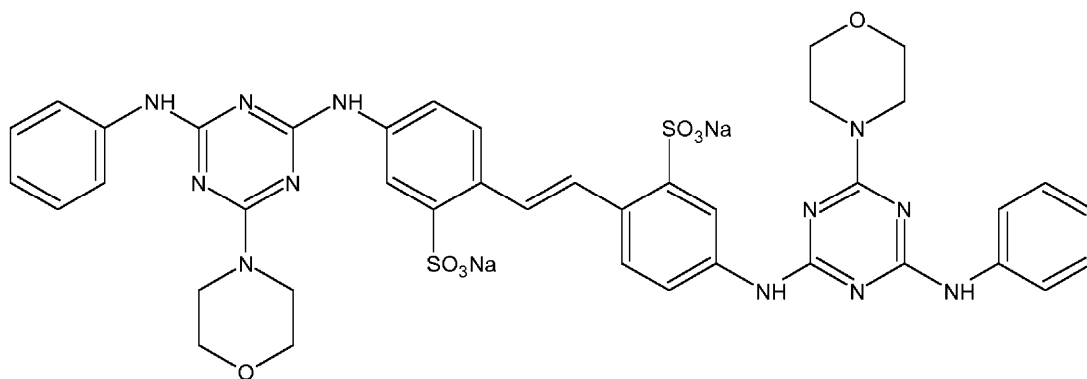
Aditivos reforzantes de la detergencia - Los productos de consumo de la presente invención pueden comprender uno o más aditivos reforzantes de la detergencia o sistemas de aditivos reforzantes de la detergencia. Cuando se usa un aditivo reforzante de la detergencia, el producto de consumo en cuestión comprenderá de forma típica al menos aproximadamente 1 %, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 60 % o incluso de aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 % de aditivo reforzante de la detergencia en peso del producto de consumo de la invención. La composición puede incluso estar sustancialmente exenta de aditivo reforzante de la detergencia; sustancialmente exenta significa "sin adición deliberada" de aditivo reforzante de la detergencia de tipo zeolita y/o fosfato. Los aditivos reforzantes de la detergencia de tipo zeolita típicos incluyen, zeolita A, zeolita P y zeolita MAP. Un aditivo reforzante de la detergencia de tipo fosfato típico es el tri-polifosfato sódico.

Agentes quelantes - Los productos de consumo de la presente invención pueden contener un agente quelante. Los agentes quelantes adecuados incluyen agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y mezclas de los mismos. Si se utiliza un agente quelante, el producto de consumo sujeto puede comprender de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 15 % o incluso de aproximadamente 3,0 % a aproximadamente 10 % de agente quelante en peso del producto de consumo. Los quelantes adecuados incluyen DTPA (ácido dietilen-triamino-pentaacético), HEDP (ácido hidroxietano difosfónico), DTPMP (dietilen-triamino-penta(ácido metilfosfónico)), sal disódica hidratada del ácido 1,2-dihidroxibenceno-3,5-disulfónico, etilendiamina, dietilen triamina, ácido etilendiaminadisuccínico (EDDS), ácido N-hidroxietilendiaminotriacético (HEDTA), ácido trietilentetraaminahexaacético (TTHA), ácido N-hidroxietiliminodiacético (HEIDA), dihidroxietilglicina (DHEG), ácido etilendiaminotetrapropionato (EDTP) y derivados de los mismos.

Agentes inhibidores de la transferencia de tintes - Los productos de consumo de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de la transferencia de tintes. Los agentes poliméricos inhibidores de la transferencia de colorantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Cuando están presentes en un producto de consumo en cuestión, los agentes inhibidores de la transferencia de tintes pueden estar presentes a niveles de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 3 % en peso del producto de consumo.

Abrillantadores - Los productos de consumo de la presente invención también pueden contener componentes adicionales que pueden teñir los artículos que se limpian, tales como abrillantadores fluorescentes.

La composición puede comprender abrillantador fluorescente C.I. 260, preferiblemente en forma alfa-cristalina que tiene la siguiente estructura:



En un aspecto, el abrillantador es un abrillantador soluble, tal como el abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma alfa-cristalina.

En un aspecto, el abrillantador está predominantemente en forma alfa-cristalina, lo que significa que de forma típica al menos 50 % en peso, al menos 75 % en peso, al menos 90 % en peso, al menos 99 % en peso o incluso sustancialmente todo el abrillantador fluorescente C.I. 260 está en forma alfa-cristalina.

El abrillantador está preferiblemente en forma de partículas micronizadas, con un tamaño de partícula primaria promedio de 3 a 30 micrómetros, de 3 micrómetros a 20 micrómetros o de 3 a 10 micrómetros.

La composición puede comprender abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma beta-cristalina y la relación en peso de: (i) abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma alfa-cristalina, a (ii) abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma beta-cristalina puede ser al menos 0,1 o al menos 0,6.

El documento BE680847 se refiere a un procedimiento para la fabricación del abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma alfa-cristalina.

Los niveles de abrillantador fluorescente adecuados incluyen niveles reducidos de aproximadamente 0,01, de aproximadamente 0,05, de aproximadamente 0,1 o incluso de aproximadamente 0,2 % en peso hasta niveles superiores de 0,5 o incluso 0,75 % en peso.

Polímero de carboxilato - Los productos de consumo de la presente invención pueden incluir también uno o más polímeros de carboxilato tales como un copolímero aleatorio de maleato/acrilato o un homopolímero de poliacrilato. En un aspecto, en polímero de carboxilato es un homopolímero de poliacrilato que tiene un peso molecular de 4000 Da a 9000 Da, o de 6000 Da a 9000 Da.

Polímero para la liberación de la suciedad - Los productos de consumo de la presente invención pueden incluir también uno o más polímeros para la liberación de la suciedad que tienen la estructura que se define mediante una de las siguientes estructuras (I), (II) o (III):



en donde:

a, b y c son de 1 a 200;

d, e y f son de 1 a 50;

Ar es un fenileno sustituido en 1,4;

sAr es fenileno sustituido en 1,3, sustituido en la posición 5 con SO_3Me ;

Me es Li, K, Mg/2, Ca/2, Al/3, amonio, mono-, di-, tri-, o tetraalquilamonio en donde los grupos alquilo son alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ o hidroxialquilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, o mezclas de los mismos;

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente de H o n-alquilo o iso-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{18}$; y

R^7 es un grupo alquilo C_1-C_{18} lineal o ramificado, o un grupo alqueno C_2-C_{30} lineal o ramificado, o un grupo cicloalquilo con 5 a 9 átomos de carbono, o un grupo arilo de C_6-C_{30} , o un grupo arilalquilo de C_6-C_{30} .

Los polímeros para la liberación de la suciedad adecuados son los polímeros para la liberación de la suciedad de poliéster tales como los polímeros Repel-o-tex, incluidos Repel-o-tex SF, SF-2 y SRP6 suministrados por Rhodia. Otros polímeros de liberación de suciedad adecuados incluyen los polímeros Texcare, incluidos Texcare SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 y SRN325 comercializados por Clariant. Otros polímeros para la liberación de la suciedad adecuados son los polímeros Marloquest tales como Marloquest SL suministrados por Sasol.

Polímero celulósico - Los productos de consumo de la presente invención pueden incluir también uno o más polímeros celulósicos incluidos los seleccionados de alquilcelulosa, alquil alcoxilalquilcelulosa, carboxialquilcelulosa, alquil carboxialquilcelulosa. En un aspecto, los polímeros celulósicos se seleccionan del grupo que comprende carboximetilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, metil carboximetilcelulosa, y mezclas de los mismos. En un aspecto, la carboximetilcelulosa tiene un grado de sustitución de carboximetilo de 0,5 a 0,9 y un peso molecular de 100.000 Da a 300.000 Da.

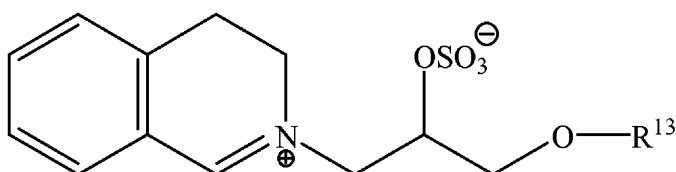
Catalizadores de blanqueo - los productos de consumo de la presente invención también pueden incluir uno o más catalizadores de blanqueo, tales como catalizadores de metal de transición, por ejemplo, como se describe en el documento EP-1109965 o EP-1240378 o 9 o catalizadores de blanqueo capaces de aceptar un átomo de oxígeno de un peroxiácido y/o sal del mismo y transferir el átomo de oxígeno a un sustrato oxidable. Los catalizadores del blanqueador adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, cationes y poliones de iminio; iones híbridos de iminio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas cíclicas de azúcar y mezclas de las mismas, como se describe en la patente US-2007/0173430 A1.

En otro aspecto, la composición detergente para lavado de ropa comprende un ingrediente blanqueador, el ingrediente blanqueador tiene un $\log P_{o/w}$ no superior a 0, no superior a -0,5, no superior a -1,0, no superior a -1,5, no superior a -2,0, no superior a -2,5, no superior a -3,0 o incluso no superior a -3,5. El método para determinar $\log P_{o/w}$ se describe en mayor detalle a continuación.

De forma típica, el ingrediente blanqueador es capaz de generar una especie blanqueadora que tiene un valor X_{SO} de 0,01 a aproximadamente 0,30, de 0,05 a aproximadamente 0,25 o incluso de aproximadamente 0,10 a 0,20. El método para determinar X_{SO} se describe en mayor detalle a continuación. Por ejemplo, los ingredientes blanqueadores que tienen una estructura de isoquinolinio pueden generar una especie blanqueadora que tiene una estructura de oxaziridinio. En este ejemplo, el X_{SO} es el de la especie blanqueadora de oxaziridinio.

Sin pretender imponer ninguna teoría, los inventores creen que el control de la electrofilicidad e hidrofobicidad de la forma anteriormente descrita permite que el ingrediente blanqueador se suministre sustancialmente solamente a las zonas del tejido que sean más hidrófobas, y que contengan suciedad rica en electrones, incluidos cromatóforos visibles, que son susceptibles al blanqueo mediante oxidantes muy electrófilos.

En un aspecto, el catalizador del blanqueador tiene una estructura que corresponde a la fórmula general siguiente:



en donde R^{13} se selecciona del grupo que consiste en 2-etilhexilo, 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo;

Método para determinar $\log P_{o/w}$

El $\log P_{o/w}$ se determina según el método descubierto en Brooke, D. N., Dobbs, A. J., Williams, N, *Ecotoxicology and Environmental Safety* (1986) 11(3): 251-260.

Método para determinar X_{SO}

El parámetro X_{SO} se determina según el método descrito en Adam, W., Haas, W., Lohray, B. B. *Journal of the American Chemical Society* (1991) 113(16) 6202-6208.

Sales de silicato - Los productos de consumo de la presente invención también pueden contener sales de silicato, tales como silicato de sodio o de potasio. La composición puede comprender de un 0 % en peso a menos de un 10 % en peso de la sal de silicato, a un 9 % en peso o a 8 % en peso o a 7 % en peso o a 6 % en peso o a 5 % en peso o a 4 % en peso o a 3 % en peso o incluso a 2 % en peso y preferiblemente de más de 0 % en peso o de 0,5 % en peso o incluso de 1 % en peso de sal de silicato. Una sal de silicato adecuada es silicato de sodio.

Dispersantes - Los productos de consumo de la presente invención también pueden contener dispersantes. Los materiales orgánicos solubles en agua adecuados incluyen 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.

Estabilizantes de enzimas - Para su uso en detergentes, las enzimas pueden estabilizarse mediante distintas técnicas. Las enzimas empleadas en la presente memoria, pueden estabilizarse mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones de calcio y/o magnesio en los productos de consumo terminados que proporcionan dichos iones a las enzimas. En el caso de productos de consumo acuosos que comprenden proteasa, se puede añadir un inhibidor reversible de la proteasa, tal como un formato de calcio, formato de sodio y 1,2 propanodiol, para mejorar más la estabilidad.

Complejos de metales catalíticos: las composiciones de los solicitantes pueden incluir complejos de metales catalíticos. Un tipo de catalizador del blanqueador que contiene metal es un sistema catalizador que comprende un catión de metal de transición con actividad catalítica del blanqueador definida, tales como catión de cobre, hierro, titanio, rutenio, tungsteno, molibdeno o manganeso, un catión de metal auxiliar que tiene poca o ninguna actividad catalítica del blanqueador, tales como catión de cinc o aluminio, y un secuestrante que tiene constantes de estabilidad definidas para los cationes de metal auxiliares y catalíticos, especialmente ácido etilendiamino tetraacético, ácido etilendiaminotetra (metilfosfónico) y sales solubles en agua de los mismos. Dichos catalizadores se divulgan en el documento US-4.430.243.

Si se desea, las composiciones de la presente memoria pueden catalizarse mediante un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y sus niveles de uso son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los catalizadores basados en manganeso divulgados en el documento US-5.576.282.

Se conocen catalizadores del blanqueador de tipo cobalto útiles en la presente invención, y se describen, por ejemplo, en las patentes US-5.597.936; US-5.595.967. Estos catalizadores de tipo cobalto se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos como los descritos, por ejemplo, en las patentes US-5.597.936 y US-5.595.967.

Las composiciones de la presente memoria también pueden incluir de manera adecuada un complejo de metal de transición de ligandos, tales como bispidonas (documento US-7.501.389) y/o ligandos rígidos macropolicíclicos - abreviados como "MRL". Como cuestión práctica, y no de forma limitante, las composiciones y procesos de la presente memoria se pueden ajustar para proporcionar del orden de al menos una parte por cien millones de MRL activo, especies en el medio de lavado acuoso, y de forma típica proporcionan de aproximadamente 0,005 ppm a aproximadamente 25 ppm, de aproximadamente 0,05 ppm a aproximadamente 10 ppm, o incluso de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 5 ppm, del MRL en la solución de lavado.

Los metales de transición adecuados en los catalizadores de metales de transición del blanqueo de la presente invención incluyen, por ejemplo, manganeso, hierro y cromo. MRL adecuados incluyen 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano.

Los MRL de metales de transición adecuados se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos como los enseñados, por ejemplo, en el documento US-6.225.464.

Disolventes - Los disolventes adecuados incluyen agua y otros disolventes, tales como fluidos lipófilos. Ejemplos de fluidos lipófilos adecuados incluyen siloxanos, otras siliconas, hidrocarburos, éteres de glicol, derivados de glicerina tales como éteres de glicerina, aminas perfluoradas, disolventes perfluorados y de tipo hidrofluoréter, disolventes orgánicos no fluorados de baja volatilidad, disolventes tipo diol, otros disolventes inocuos para el medio ambiente y mezclas de los mismos.

Procesos para preparar productos de consumo

Los productos de consumo de la presente invención pueden formularse de cualquier forma adecuada y pueden prepararse mediante cualquier proceso elegido por el formulador, de los cuales se describen ejemplos no limitativos, en los ejemplos de los solicitantes y en los documentos US-4.990.280; US-20030087791A1; US-20030087790A1; US-20050003983A1; US-20040048764A1; US-4.762.636; US-6.291.412; US-20050227891A1; EP-1070115A2; US-5.879.584; US-5.691.297; US-5.574.005; US-5.569.645; US-5.565.422; US-5.516.448; US-5.489.392; US-5.486.303.

Método de uso

La presente descripción incluye un método para limpiar y/o tratar un sitio, entre otros, una superficie de un tejido. Dicho método incluye las etapas de poner en contacto una realización del producto de consumo de limpieza de los solicitantes,

en forma pura o diluida en una solución de lavado con, al menos, una parte de un sitio, aclarando a continuación de forma opcional dicha superficie del tejido. El sitio puede someterse a una etapa de lavado previa a la etapa de aclarado anteriormente mencionada. Para los fines de la presente descripción, el lavado incluye, aunque no de forma limitativa, frotado y agitación mecánica. Por tanto, la presente divulgación, incluye un método para lavar un tejido. El método comprende las etapas de poner en contacto un tejido que se va a lavar con dicha solución limpiadora para lavado de ropa que comprende, al menos, una realización del producto de consumo de los solicitantes. El tejido puede comprender la mayoría de los tejidos capaces de ser lavados en condiciones normales de uso por parte del consumidor. La solución tiene de forma típica un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 11. Los productos de consumo pueden emplearse a concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15.000 ppm, en disolución. Las temperaturas del agua de forma típica están en el intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 90 °C. La relación entre agua y tejido es de forma típica de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

En un aspecto, se divulga un sitio tratado con cualquiera de los productos de consumo divulgados en la presente memoria.

Métodos de ensayo

Método de ensayo 1

A continuación se indica un protocolo para definir si un material de tinte o de pigmento es un agente de matizado de tejidos para el fin de la presente invención:

1.) Llenar dos recipientes Tergotometer con 800 ml de agua de la red de suministro urbano de Newcastle upon Tyne, Reino Unido (~12 granos por galón americano de dureza total, suministrada por Northumbrian Water, Pity Me, Durham, Co. Durham, Reino Unido).

2) Insertar los recipientes en el aparato Tergotometer, con la temperatura de agua controlada a 30 °C y la agitación fijada en 40 rpm durante el tiempo que dura el experimento.

3) Añadir 4,8 g de detergente IEC-B (detergente tipo B para una lavadora de referencia base IEC 60456), suministrado por wfk, Brüggem-Bracht, Alemania, a cada recipiente.

4) Al cabo de dos minutos, añadir 2,0 mg de colorante activo al primer recipiente.

5) Al cabo de un minuto, añadir 50 g de camiseta de algodón liso (suministrado por Warwick Equest, Consett, County Durham, Reino Unido), cortado en muestras de 5 cm x 5 cm, a cada recipiente.

6) Al cabo de 10 minutos, vaciar los recipientes y volverlos a llenar con (16 °C) con un grado de dureza de 14,4 grados ingleses de dureza Clark con una relación molar de calcio a magnesio de 3:1.

7) Al cabo de 2 minutos de aclarado, retirar los tejidos.

8) Repetir las etapas 3-7 durante tres ciclos más usando los mismos tratamientos.

9) Recoger y tender los tejidos en un recinto cerrado durante 12 horas para que se sequen.

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

11) Promediar los valores Hunter a y Hunter b para cada conjunto de tejidos. Si los tejidos tratados con colorante sometidos a valoración muestran una diferencia de tono promedio superior a 0,2 unidades en el eje a o en el eje b, se considera que es un agente de matizado de tejidos para el propósito de la invención.

Métodos de ensayo 2-6

Cualquier desviación de los protocolos proporcionados, se indican en los ejemplos pertinentes.

Los ensayos se realizaron usando un robot Biomek FX (Beckman Coulter) o una pipeta multicanal (p. ej., Rainin PipetLite, Mettler-Toledo) y un lector de MTP SpectraMax (tipo 340; Molecular Devices).

Ensayo TCA para la determinación del contenido de proteína en placas de microtitulación de 96 pocillos

Se cultivaron cultivos de *B. subtilis* 2-3 días a 37 °C, agitando a 250-300 rpm con aireación humidificada. Las células se separaron del sobrenadante del cultivo que contenía la enzima, por centrifugación y/o filtración. La concentración de proteasa se determinó usando un ensayo de precipitación TCA. Se transfirió una alícuota (20-25 µl) de sobrenadante de cultivo a una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (MTP; placa de poliestireno transparente de unión media Costar 9017) que contiene 100 µl/pocillo de HCl 0,25 N. La lectura "basal" se determinó mediante lectura

de la dispersión/absorbancia de la luz a 405 nm después de 5 s de mezcla. Se añadieron 100 µl/pocillo de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % (p/v) a la placa que contenía HCl y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para facilitar la precipitación de proteínas. La dispersión/absorbancia de la luz a 405 nm de esta placa “de ensayo” se determinó después de 5 s de mezcla. La turbidez/aumento de la dispersión de la luz en las muestras se correlaciona con la cantidad total de proteína precipitable en el sobrenadante de cultivo. Los cálculos se realizaron restando la lectura “basal” (obtenida después de la adición de HCl) a la lectura “de ensayo” (obtenida después de la adición de TCA), para proporcionar una medida relativa de la proteína total presente. Si se desea, se puede crear una curva patrón calibrando las lecturas de TCA con ensayos de proteasa AAPF (véase más adelante) de clones con actividad específica conocida. Sin embargo, los resultados de TCA son lineales con respecto a la concentración de proteína de 50 a 500 partes por millón (ppm) de proteína (en donde 1 ppm corresponde a 1 mg/l) y por lo tanto se pueden trazar directamente en función del rendimiento de la enzima, con el fin de escoger variantes con el rendimiento deseado.

Ensayo de proteasa AAPF en placas de microtitulación de 96 pocillos

Con el fin de determinar la actividad de proteasa de las variantes de serina proteasa, se midió la hidrólisis de N- succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). Las soluciones de reactivos usados fueron: Tris/HCl 100 mM, pH 8,6, que contiene TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de dilución de Tris); tampón Tris 100 mM, pH 8,6, que contiene CaCl₂ 1 mM y TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de Tris/Ca); y 160 mM de suc-AAPF-pNA en DMSO (solución madre suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Para preparar una solución de trabajo de suc-AAPF-pNA, se añadió 1 ml de solución madre suc-AAPF-pNA a 100 ml de tampón Tris/Ca y se mezcló bien durante al menos 10 segundos. El ensayo se realizó mediante la adición de 10 µl de solución de proteasa diluida a cada pocillo de una MTP de 96 pocillos, inmediatamente seguido de la adición de 190 µl de solución de trabajo de suc-AAPF-pNA de 1 mg/ml. Las soluciones se mezclaron durante 5 s y se realizó la lectura del cambio de absorbancia en el modo de cinética (25 lecturas en 5 minutos) a 405 nm en un lector de MTP, a 25 °C. La actividad de la proteasa se expresó como AU (actividad = $\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$).

Ensayo de inhibición de eglina C

Como se describe en la presente memoria, la concentración de proteasa y la actividad específica se determinaron por titulación con un inhibidor denominado eglina C. La eglina C, obtenida de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* es un inhibidor de proteína de unión estrecha de subtilisinas y proteasa ASP (Heinz y col, *Biochemistry*, 31: 8755-66 [1992]) y por lo tanto se puede usar para medir la concentración de enzima proteasa, que permite, a su vez, calcular la actividad específica. El gen de la eglina C se sintetizó y se expresó en *E. coli* mediante métodos estándar. Sus propiedades y su capacidad inhibitoria eran las mismas que eglina C adquirida de Sigma.

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

Se diluyó una muestra de la subtilisina de *Bacillus lentus* de actividad específica conocida en tampón Tris 100 mM, pH 8,6, que contiene CaCl₂ 1 mM y TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón Tris/Ca), a una concentración adecuada para el ensayo de proteasa AAPF descrito anteriormente. Se prepararon varias diluciones de la solución madre de eglina C en el tampón de Tris/Ca. Se mezcló una alícuota de cada solución diluida de eglina C con un volumen igual de la solución de subtilisina de *Bacillus lentus* diluida. Se mezcló también una alícuota del tampón Tris/Ca, solo, sin eglina C, con un volumen igual de la solución de subtilisina de *Bacillus lentus* diluida, con el fin de medir la actividad de subtilisina sin inhibición en ausencia de eglina C. Las soluciones mezcladas se incubaron a temperatura ambiente durante 15-30 minutos y a continuación, se midió la actividad de proteasa de cada muestra por el ensayo AAPF descrito anteriormente. Usando la actividad específica conocida de subtilisina de *Bacillus lentus*, se determinó la concentración de proteasa activa en cada muestra. A continuación, se calculó la concentración de eglina C en cada muestra, basándose en la disminución de la actividad de proteasa observada, en comparación con la muestra de subtilisina sin inhibición que se mezcló solo con tampón Tris/Ca (sin eglina C). Por lo tanto, usando diluciones y volúmenes conocidos de las soluciones con eglina C, se determinó la concentración de eglina C en la solución madre.

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

Se diluyeron muestras de variantes de subtilisina en tampón Tris 100 mM, pH 8,6, que contiene CaCl₂ 1 mM y TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de Tris/Ca). Se prepararon también varias diluciones de la solución madre de eglina C de concentración conocida en el tampón de Tris/Ca. Se mezcló una alícuota de cada solución diluida de eglina C con un volumen igual de una solución de una variante de subtilisina. Las soluciones mezcladas se incubaron a temperatura ambiente durante 15-30 minutos y a continuación, se midió la actividad de proteasa de cada muestra mediante el ensayo AAPF. Usando la disminución observada de la actividad de la proteasa después de la adición de cada muestra de eglina C y la concentración conocida de la eglina C, se calculó la concentración de la eglina C necesaria para la inhibición completa de cada variante de enzima subtilisina. Esta concentración es equivalente a la concentración de enzima en la muestra. Se mezcló también una alícuota del tampón Tris/Ca solo, sin eglina C, con cada muestra de variante de subtilisina y se midió la actividad de la proteasa en ausencia de eglina C mediante el ensayo AAPF. A continuación, se calculó la actividad específica de las variantes de subtilisina, usando las concentraciones de enzima como se determinó anteriormente.

Ensayo de micromuestras de tela SLT (ensayo SLT)

Se obtuvieron micromuestras de tela preaclaradas y troqueladas manchadas con sangre, leche y tinta (SLT) (EMPA116) con un diámetro circular de 5,5 milímetros en placas de microtitulación de 96 pocillos (MTP; Corning 3641) del centro de materiales de ensayo BV (Vlaardingen, Países Bajos).

- 5 Los detergentes se prepararon mezclando durante al menos 30 minutos en carbonato de sodio 2 mM, tamponado a pH 10,3 con el nivel adecuado de dureza del agua (3:1 de Ca:Mg. - CaCl_2 : $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en agua Milli-Q como se describe en la Tabla 1-1 y en la Tabla 6-4. Los detergentes se dividieron en alícuotas en tubos cónicos (Falcon) de 50 ml, se centrifugó para eliminar el precipitado y se enfrió sobre hielo durante 30 minutos antes de su uso.
- 10 Se igualaron las concentraciones de enzima a una concentración fija deseada que oscila de 20-50 ppm en relación a un nivel de GG36 purificada (enzima de la Id. de sec. n.º:1). La actividad específica de GG36 usando AAPF como sustrato se usó para convertir los valores de TCA a los que se han restado los basales en la concentración de enzima en ppm. Una vez que se determinó la concentración de enzima en ppm, se usó una fórmula sencilla para calcular el volumen de cada variante que se requería añadir a un volumen fijo de tampón
- 15 (300-600 µl) con el fin de conseguir la concentración de enzima madre deseada:

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

Donde x = volumen de la enzima, y = concentración de la enzima, v_b = volumen de tampón

- 20 Se usó un robot Perkin-Elmer Janus con un brazo de 8 canales Versispan para dispensar volúmenes variables de enzima a partir de la placa fuente (placa de pocillos Axygen de media profundidad con variantes recogidas agrupadas usadas en el ensayo TCA de la concentración de enzima) en la placa de destino llena de tampón, usando puntas conductoras. Las muestras se mezclaron tres veces pipeteando arriba y abajo. Se validó la
- 25 precisión de las diluciones de enzima mediante la medición de la actividad de AAPF de la placa igualada y comparándola con la de la placa fuente, para verificar que se habían preparado las diluciones correctas.

- Después de la igualación, se añadieron 5-15 µl de solución de enzima a una placa de micromuestras de tela llena de detergente para alcanzar un volumen final de ~200 µl. En algunos casos, las muestras de enzima no se
- 30 igualaron y en cambio se diluyeron todas por igual a partir de la placa madre para proporcionar un intervalo de trabajo de 0,1-5 ppm. Se determinaron las concentraciones diana óptimas para cada ensayo a partir de una curva de respuesta a la dosis que mide la actividad de limpieza en este intervalo para un detergente dado.

- La MTP se selló con film (Bio-Rad) y se incubó en incubador/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) preajustado a
- 35 16 °C en un ambiente frío ajustado a 4 °C o a 32 °C en la mesa de trabajo durante 30 minutos a 1400 rpm. Después de la incubación, se transfirieron 120 µl del sobrenadante a una MTP nueva (Corning 9017) y se realizó la lectura a 600 nm usando el lector SpectraMax. Las lecturas de absorbancia reales se obtuvieron restando un control de blanco (sin enzima) a cada valor.

- 40 Se calculó un índice de rendimiento (IR) para cada variante. El índice de rendimiento es la relación de la absorbancia del sobrenadante producido por la variante de enzima de limpieza a la absorbancia producida por la GG36 de limpieza a una concentración de enzima fija. Para las placas igualadas, se calcularon los valores de IR dividiendo la absorbancia de una variante entre la del control en una placa dada. Para las placas no igualadas, se genera una curva patrón (p. ej., modelo de ajuste de regresión no lineal de Langmuir o de cuatro parámetros), a partir de la actividad y concentración de
- 45 enzima de los controles. Usando esta curva patrón, se puede comparar el rendimiento de las variantes directamente con el control a cualquier concentración de enzima. El IR se determina dividiendo la absorbancia de las variantes entre la absorbancia calculada para el control a la misma concentración de enzima.

- Un índice de rendimiento (IR) que es superior a 1 ($\text{IR} > 1$), indica una limpieza superior por una variante, en
- 50 comparación con el patrón (p. ej., GG36), mientras que un IR de 1 ($\text{IR} = 1$) identifica una variante que rinde igual que el patrón y un IR que es inferior a 1 ($\text{IR} < 1$), identifica una variante con un rendimiento inferior al del patrón.

TABLA 1-1: Concentraciones finales de detergente, de dureza del agua y de tampón usadas para los ensayos con micromuestras de tela SLT			
Detergente	Concentración final de detergente (g/l)	Dureza final del agua* (gpg)	Concentración final de tampón de carbonato de sodio (mM)
Ejemplo 26	0,808	6	2
Ejemplo 27	1	3	2
Ejemplo 28	2,3	12	2
Ejemplo 29	5,9	12	2
Ejemplo 30	8,3	12	2

* Concentración (Ca:Mg 3:1) como se detalla en el texto.

METODO DE ENSAYO 2 - Para el método de ensayo 2, se lleva a cabo el ensayo de micromuestras de tela SLT usando el detergente del Ejemplo 29. El detergente se disuelve en agua que tiene una dureza de 12 gpg y se ajusta a una temperatura de 16 °C. Después, se determina el rendimiento de las enzimas variantes según el ensayo de micromuestras de SLT descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la variante con el de la enzima de la Id. de sec. n.º 1, siendo en todos los casos el intervalo de dosificación de la enzima de 0,1-5 ppm. Las enzimas que tienen un índice de rendimiento de 1,1 o superior, se consideran proteasas de agua fría.

METODO DE ENSAYO 3 - Para el método de ensayo 3, se lleva a cabo el ensayo de micromuestras de SLT usando el detergente del Ejemplo 26. El detergente se disuelve en agua que tiene una dureza de 6 gpg y se ajusta a una temperatura de 16 °C. Después, se determina el rendimiento de las enzimas variantes según el ensayo de micromuestras de SLT descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la variante con el de la enzima de la Id. de sec. n.º 1, siendo en todos los casos el intervalo de dosificación de la enzima de 0,1-5 ppm. Las enzimas que tienen un índice de rendimiento de 1,1 o superior, se consideran proteasas de agua fría.

METODO DE ENSAYO 4 - Para el método de ensayo 4, se lleva a cabo el ensayo de micromuestras de tela SLT usando el detergente del Ejemplo 26. El detergente se disuelve en agua que tiene una dureza de 6 gpg y se ajusta a una temperatura de 16 °C. Después, se determina el rendimiento de las enzimas variantes según el ensayo de micromuestras de SLT descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la variante con el de la enzima de referencia, siendo dicha enzima de referencia la enzima de la Id. de sec. n.º 1 que comprende la mutación A158E, siendo en todos los casos el intervalo de dosificación de la enzima de 0,1-5 ppm. Las enzimas que tienen un índice de rendimiento de 1,0 o superior, se consideran proteasas de agua fría.

MÉTODOS DE ENSAYO 5 - Se ensaya la conductividad eléctrica de una solución acuosa, de acuerdo con el método estándar ASTM D1125 y se presenta en unidades de miliSiemens/cm, abreviado a mS/cm en esta patente.

METODO DE ENSAYO 6 - Para el método de ensayo 6, se lleva a cabo el ensayo de micromuestras de tela SLT usando uno de los detergentes de los Ejemplos 36a - 36n. El detergente se disuelve en agua que tiene una dureza tal como se especifica en la Tabla 6-4 y se ajusta a una temperatura de 16 °C. Después, se determina el rendimiento de las enzimas variantes según el ensayo de micromuestras de SLT descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la variante con el de la enzima de la Id. de sec. n.º 1, siendo en todos los casos el intervalo de dosificación de la enzima de 0,1-5 ppm. Las enzimas que tienen un índice de rendimiento de 1,1 o superior, se consideran proteasas de agua fría.

Ejemplos

Ejemplos 1-8

Composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa adecuadas para lavadoras de carga frontal.

Ingrediente	Composición (% en peso de la composición)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ácido alquilbenceno sulfónico	7	11	4,5	1,2	1,5	12,5	5,2	4
Alquil C ₁₂₋₁₄ etoxi 3 sulfato sódico	2,3	3,5	4,5	4,5	7	18	1,8	2
Alquil C ₁₄₋₁₅ 8-etoxilato	5	8	2,5	2,6	4,5	4	3,7	2
Óxido de alquildimetilamina C ₁₂	-	-	0,2	-	-	-	-	-
Cloruro de alquil C ₁₂₋₁₄ hidroxietildimetilamonio	-	-	-	0,5	-	-	-	-
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	2,6	4	4	2,6	2,8	11	2,6	1,5
Ácido cítrico	2,6	3	1,5	2	2,5	3,5	2,6	2
Proteasa*	0,05	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02
Amilasa (Natalase®)	0,1	0,2	0,15	-	0,05	0,5	0,1	0,2
Mananasa (Mannaway®)	0,05	0,1	0,05	-	-	0,1	0,04	-
Copolímero de injerto al azar ¹	1	0,2	1	0,4	0,5	2,7	0,3	1
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	0,4	2	0,4	0,6	1,5	1,8	0,7	0,3
Polietilenimina etoxilada ²	-	-	-	-	-	0,5	-	-
Polímero limpiador de grasa alcoxilado anfifílico ³	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3
Polímero para la liberación de la suciedad	-	-	-	-	-	-	0,3	-

con bloques cortos de politereftalato de 1,2 propileno dietoxilado.								
Ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)	0,2	0,3	-	-	0,2	-	0,2	0,3
Ácido hidroxietano difosfónico	-	-	0,45	-	-	1,5	-	0,1
FWA	0,1	0,2	0,1	-	-	0,2	0,05	0,1
Disolventes (1,2 propanodiol, etanol), estabilizantes	3	4	1,5	1,5	2	4,3	2	1,5
Estructurante derivado del aceite de ricino hidrogenado	0,4	0,4	0,3	0,1	0,3	-	0,4	0,5
Ácido bórico	1,5	2,5		1,5	1,5	0,5	1,5	1,5
Formiato sódico	-	-	-	1	-	-	-	-
Inhibidor de proteasa reversible ⁴	-	-	0,002	-	-	-	-	-
Perfume	0,5	0,7	0,5	0,5	0,8	1,5	0,5	0,8
Suspensión acuosa de microcápsulas de perfume (30 %am)	0,2	0,3	0,7	0,2	0,05	0,4	0,9	0,7
Tinte de matizado de tiofeno etoxilado ⁵	0,005	0,007	0,010	0,008	0,008	0,007	0,007	0,008
Tampones (hidróxido sódico, monoetanolamina)	Hasta pH 8,2							
Agua y componentes minoritarios (antiespumante, estética)	Hasta 100 %							

Ejemplos 9-16

Composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa adecuadas para lavadoras de carga superior.

5

Ingrediente	Composición (% en peso de la composición)							
	9	10	11	12	13	14	15	16
Alquiletoxi(1,8)sulfato C ₁₂₋₁₅	20,1	15,1	20,0	15,1	13,7	16,7	10,0	9,9
Alquilbenceno sulfonato C _{11,8}	2,7	2,0	1,0	2,0	5,5	5,6	3,0	3,9
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	6,5	4,9		4,9	3,0	9,0	2,0	
Alquil C ₁₂₋₁₄ 9-etoxilato	0,8	0,8	0,8	0,8	8,0	1,5	0,3	11,5
Óxido de dimetilamina C ₁₂			0,9					
Ácido cítrico	3,8	3,8	3,8	3,8	3,5	3,5	2,0	2,1
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	2,0	1,5	2,0	1,5	4,5	2,3		0,9
Proteasa*	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Amilasa (Natalase®)	0,7	0,3	0,6	0,3	0,6	0,4		
Amilasa (Termamyl Ultra®)								1,1
Mananasa (Mannaway®)	0,1					0,1		
Pectato Liasa (Pectawash®)	0,1					0,2		
Bórax	3,0	3,0			2,0	3,0	3,0	3,3
Na & formiato de Ca	0,2	0,2		0,2	0,2		0,7	
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ - (CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	1,6	1,6	3,0	1,6	2,0	1,6	1,3	1,2
Copolímero de injerto al azar ¹	0,4	0,2	1,0	0,5	0,6	1,0	0,8	1,0
Ácido dietilentriamino pentaacético	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,3	0,8	
Tinopal AMS-GX	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	
Tinopal CBS-X						0,1		0,2
Polímero limpiador de grasa alcoxlado anfílico ³	1,0	1,3	1,3	1,4	1,0	1,1	1,0	1,0
Texcare 240N (Clariant)				1,0				
Etanol	2,6	2,6	2,6	2,6	1,8	3,0	1,3	
Propilenglicol	4,6	4,6	4,6	4,6	3,0	4,0	2,5	
Dietilenglicol	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,7	3,6	
Polietilenglicol	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	1,4

Monoetanolamina	2,7	2,7	2,7	2,7	4,7	3,3	1,7	0,4
Trietanolamina								0,9
NaOH	hasta pH 8,3	hasta pH 8,3	hasta pH 8,3	hasta pH 8,3	hasta pH 8,3	hasta pH 8,3	hasta pH 8,3	hasta pH 8,5
Supresor de las jabonaduras								
Tinte	0,01	0,01	0,01		0,01	0,01	0,01	0,0
Perfume	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,8	0,6
Suspensión acuosa de microcápsulas de perfume (30 %am)	0,2	0,5	0,2	0,3	0,1	0,3	0,9	1,0
Tinte de matizado de tiofeno etoxilado ⁵	0,003	0,002	0,002	0,005	0,002	0,004	0,004	0,003
Agua	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Ejemplos 17-22

A continuación se presentan composiciones detergentes granuladas adecuadas para el lavado de tejidos.

5

	17	18	19	20	21	22
Alquilbenceno sulfonato lineal con una longitud de cadena de carbono alifática de C ₁₁ -C ₁₂	15	12	20	10	12	13
Otros tensioactivos	1,6	1,2	1,9	3,2	0,5	1,2
Agente(s) reforzante(s) de la detergencia de tipo fosfato	2	3	4			
Zeolita		1		1	4	1
Silicato	4	5	2	3	3	5
Carbonato sódico	2	5	5	4	0	3
Poliacrilato (PM 4500)	1	0,6	1	1	1,5	1
Carboximetilcelulosa						
(Finnfix BDA de CPKelco)	1	-	0,3	-	1,1	-
Celluclean® (15,6 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Proteasa*	0,23	0,17	0,05	0,2	0,03	0,1
Stainzyme Plus® (14 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Mannaway 4.0T (4 mg/g)	0,1			0,1		0,1
Lipex 100T (18,6 mg/g)	0,2		0,1		0,3	
Abrillantador(es) fluorescente(s)	0,16	0,06	0,16	0,18	0,16	0,16
Ácido dietilentriaminopentaacético o ácido etilendiaminotetraacético	0,6		0,6	0,25	0,6	0,6
MgSO ₄	1	1	1	0,5	1	1
Blanqueador(es) y activador(es) del blanqueador	6,88		6,12	2,09	1,17	4,66
Tinte de matizado de tiofeno etoxilado ⁵	0,002	0,001	0,003	0,003	-	-
Direct Violet 9 ex Ciba Specialty Chemicals				0,0006	0,0004	0,0006
Sulfato/ácido cítrico/bicarbonato sódico/humectante/perfume	Resto hasta 100 %					

¹ El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

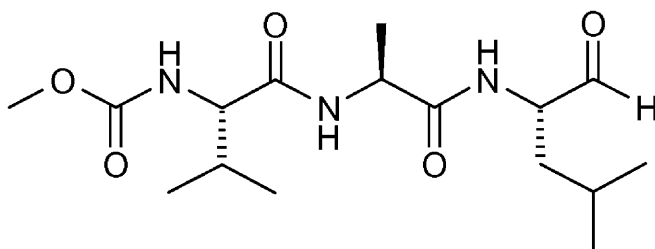
² Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

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

⁴ Inhibidor de la proteasa reversible de estructura:

10

15



⁵ El tinte de matizado de tiofeno etoxilado es como se describe en el documento US-7.208.459 B2.

* Observación: todos los niveles enzimáticos se expresan como % de materia prima enzimática, excepto para la proteasa (de esta invención), que se expresa como % de proteína activa añadida al producto.

Ejemplos 23-25

Las siguientes son composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa adecuadas para lavadoras (23 y 24) automáticas de carga superior y lavadoras (25) de carga frontal.

Ingrediente	Composición (% en peso de la composición)		
	23	24	25
Alquil C ₁₂₋₁₅ etoxi (1,8)sulfato	14,7	11,6	
Alquilbenceno sulfonato C _{11,8}	4,3	11,6	8,3
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	1,7	1,29	
Alquil C ₁₂₋₁₄ 9-etoxilato	0,9	1,07	
Óxido de dimetilamina C ₁₂	0,6	0,64	
Ácido cítrico	3,5	0,65	3
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	1,5	2,32	3,6
Borato sódico (Bórax)	2,5	2,46	1,2
Alquil C ₁₂₋₁₄ etoxi 3 sulfato sódico			2,9
Alquil C ₁₄₋₁₅ 7-etoxilato			4,2
Alquil C ₁₂₋₁₄ 7-etoxilato			1,7
Formiato de Ca	0,09	0,09	
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)- bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo			1,2
Copolímero de injerto al azar ¹		1,46	0,5
Polietilenimina etoxilada ²	1,5	1,29	
Ácido dietilentriamino pentaacético	0,34	0,64	
Ácido dietilentriamina penta(metilenfosfónico)			0,3
Tinopal AMS-GX		0,06	
Tinopal CBS-X	0,2	0,17	
Polímero limpiador de grasa alcoxilado anfifílico ³	1,28	1	0,4
Etanol	2	1,58	1,6
Propilenglicol	3,9	3,59	1,3
Dietilenglicol	1,05	1,54	
Polietilenglicol	0,06	0,04	
Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4
NaOH	2,44	1,8	
Sulfonato de cumeno sódico			1
Formiato sódico		0,11	
Agua, componentes estéticos (Tintes, perfumes) y componentes minoritarios (enzimas, disolventes, estructurantes)	Resto	Resto	Resto

¹ El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación

de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

2 Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

3 El polímero limpiador de grasa anfílico alcoxilado es una polietilenimina (PM = 600) con 24 grupos etoxilato por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH

Ejemplos 26-30

Las siguientes son composiciones detergentes granulares para lavado de ropa adecuadas para lavadoras (26-28) automáticas de carga superior y lavadoras (29-30) de carga frontal.

La proteasa de esta invención se añade por separado a estas formulaciones.

	26	27	28	29	30
Tensioactivos					
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	3,55				
Alquil C ₁₂₋₁₄ sulfato			1,5		
Sulfonato de alquibenceno lineal de sodio con una longitud de cadena de carbono alifática de C _{11-C12}	9,6	15,8	10,6	7,5	9
Alcohol etoxi C _{14 15} - 3- sulfato de sodio	1,15			2,88	
Alquil C _{14/15} sulfato de sodio	2,37				
Etoxilado de alcohol C _{14/15} con un promedio de etoxilación de 7 moles				1,17	1
Cloruro de mono alquil C ₈₋₁₀ mono-hidroxietil-dimetil-amonio cuaternario					0,45
Cloruro de dimetil-hidroxil-etil-lauril-amonio			0,18		
Zeolita A	13,9	4,7	0,01	2,9	1,8
Silicato de sodio a una relación de 1,6	4	0,2		4	4
Silicato de sodio a una relación de 2,35			8		
Ácido cítrico				2,5	1,4
Tripolifosfato de sodio			5		
Carbonato sódico	24,1	30	16,9	24,4	21
Nonanoiloxibencenosulfonato	5,78	2,81	0,96		
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina				0,03	0,017
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio				0,2	
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metilen fosfónico)	0,61				0,33
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico				0,29	0,45
Tetraacetato de etilendiamina			0,27		
MgSO ₄			0,47	0,5994	0,782
Percarbonato de sodio	7	4,4		15,9	19,1
Tetraacetil etilendiamina				3,3	4,6
Perborato de sodio monohidratado			1,2		
Carboximetilcelulosa					
(p. ej. Finnfix BDA de CPKelco)	0,1		0,17	1,69	0,23
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (70/30) de sodio	0,0236	3,8		2	2,5
Poliacrilato sódico (Sokalan PA30 CL)	4		0,84		
Polímero de tereftalato				0,23	
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo			0,89	0,89	0,91
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc			0,005	0,001	0,002
Abrillantador fluorescente C.I. 260	0,11	0,15	0,04	0,23	0,15
Abrillantador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)			0,1		
Gránulo supresor de las jabonaduras		0,25		0,07	0,04
Carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente			0,019	0,028	

(Finnifix ® SH-1)					
Bentonita			8,35		
Misceláneos (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Notas para los Ejemplos 26-30:

- 5 Los ingredientes tensioactivos pueden obtenerse de BASF, Ludwigshafen, Alemania (Lutensol®); Shell Chemicals, Londres, Reino Unido; Stepan, Northfield, Illinois, Estados Unidos; Huntsman, Huntsman, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos; Clariant, Sulzbach, Alemania (Praepagen®).

La zeolita puede obtenerse de Industrial Zeolite (UK) Ltd, Grays, Essex, Reino Unido.

- 10 El ácido cítrico y el citrato de sodio pueden obtenerse de Jungbunzlauer, Basilea, Suiza.

El percarbonato sódico, el carbonato sódico, el bicarbonato sódico y el sesquicarbonato sódico pueden obtenerse de Solvay, Bruselas, Bélgica.

- 15 Los copolímeros de acrilato/maleato se pueden obtener de BASF, Ludwigshafen, Alemania.

La carboximetilcelulosa y carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente se pueden obtener de CPKelco, Arnhem, Países Bajos. El abrillantador fluorescente

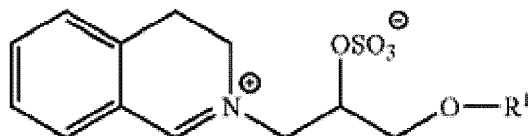
- 20 C.I. 260 se puede obtener de 3V Sigma, Bergamo, Italia como Optiblanco® Optiblanco® 2M/G, Optiblanco® 2MG/LT Extra u Optiblanco® Ecobright.

El etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio se puede obtener de Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido.

- 25 El copolímero de tereftalato puede obtenerse de Clariant con el nombre comercial Repelotex SF 2.

El ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico puede obtenerse de Thermphos, Vlissingen -Oost, Países Bajos.

- 30 El reforzador de blanqueo basado en oxaziridinio tiene la siguiente estructura, en donde R¹ = 2-butiloctilo, y se produjo según el documento US-2006/0089284A1.



- 35 Las enzimas Natalase®, Termamyl®, Stainzyme Plus®, Celluclean® y Mannaway®, se pueden obtener de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.

El tetrasulfonato de ftalocianina de zinc se puede obtener de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza, como Tinolux® BMC.

- 40 El gránulo supresor de espuma se puede obtener de Dow Corning, Barry, Reino Unido.

- 45 El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de óxido de polietileno injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

Ejemplo 31

- 50 Generación de bibliotecas de evaluación de sitios (SEL) de GG36

- 55 La construcción de SEL de GG36 descrita en este ejemplo fue realizada por GENEART usando sus métodos patentados y su plataforma tecnológica para la optimización de genes, síntesis génica, generación y análisis de bibliotecas (en el documento WO 2004/059556A3, EP-0 200 362 y EP-0 201 184; y en la patente US-4.683.195, US-4.683.202 y US-6.472.184). Las SEL GG36 se produjeron en posiciones seleccionadas previamente por los inventores, usando el plásmido de expresión pHPLT-GG36 de *B. subtilis* (véase la Fig. 2). Este plásmido de expresión de *B. subtilis* contiene el casete de expresión de GG36 que se muestra a continuación, el promotor LAT

de *B. licheniformis* (Plat) y elementos adicionales de pUB110 (McKenzie y col., Plasmid, 15:93-103 1986), que incluyen un gen replicasa (reppUB), un gen de resistencia a la neomicina (neo)/kanamicina y un marcador de resistencia a la bleomicina (bleo) (Figura 4 de la patente US-6.566.112).

- 5 Secuencia de ADN de GG36 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, el propéptido en minúsculas con texto subrayado y la secuencia madura de GG36 en letras mayúsculas)

gtgagaagcaaaaaattgtggtatcgctgcgctgaccgcactactcatttctgttgccttcagttcatcgatcgcatcggtgctgaagaagcaaaaataatatttaatt
 10 ggctttaatgagcaggaagcgtgctgagttttagaacaagtagagggcaaatgacgaggtcgccattctctgaggaagaggaagtcgaattgaattgcttcat
gaatttgaacgattcctgtttatccgttgagtttaagcccagaagatgtggacgcgcttgagctcgatccagcgatttcttatattgaagaggaatgcagaagtaacgac
aatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTT
 TGGTGTAAAAGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTT
 TGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCAGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTA
 AACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCG
 15 GTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTG
 AGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGT
 GTAGCGGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCG
 GAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGACCAGGT
 GTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTT
 20 GCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAAT
 ACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA

La Id. de sec. n.º 4 es la secuencia completa, incluidos el propéptido y el péptido de señal.

- 25 Secuencia de proteína de GG36 (se muestra la secuencia señal en letras minúsculas, el propéptido, en minúsculas con texto subrayado y la secuencia de proteasa madura de GG36 en letras mayúsculas)

vrskklwivastallisvafssiasaaeeakekyligfnegeavsefveqveandevailseeeveieillhefetipV1svelspedvdaleldpaisyieedaevt
 30 tmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSVGVAV1DTGISTHPDLNIRGGASVFPGEPTQDGNHGHGTHVAGTIAALN
NSIGV1GVAPSAELYAVKV1GASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGV1VVAA
 SGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAA
 ALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR

La Id. de sec. n.º 1 es la secuencia madura y la Id. de sec. n.º 3 incluye también la señal y el propéptido.

- 35 El procedimiento de mutagénesis se basó en el enfoque de mutación específica de codón, en el que todas las posibles sustituciones de aminoácidos se crean simultáneamente en un codón de interés específico, usando cebadores de mutagénesis directos e inversos que contienen un codón degenerado, NNS ((A, C, T o G), (A, C, T o G), (C o G)) en el sitio de interés. Para construir cada una de las SEL de GG36, se realizaron tres reacciones de PCR: dos reacciones de mutagénesis (PCR1 y PCR2 primarias) para introducir el codón de interés mutado en la secuencia de ADN de GG36
 40 madura, usando los cebadores de mutagénesis directos e inversos de NNS (25-45 nucleótidos de longitud) y una tercera reacción para fusionar los dos productos de PCR de mutagénesis juntos, para construir el vector de expresión pHPLT-GG36 que tiene los codones mutados deseados en la secuencia de GG36 madura.

- 45 Las secuencias de cebadores usadas en este ejemplo se proporcionan a continuación:

CGCGCTT GAGCT CGATCCAGCGATTTT	SacI-Fw
GTCTCCA AGCTTT AACGAGTTGCAG	HindIII-Rv
GCAATTC AGATCTT CCTTCAGGTTATGACC	pHPLT-BgIII-Fw
GCATCGA AGATCT GATTGCTTAAGTCTTC	pHPLT-BgIII-Rv

- Se usó el ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (n.º de catálogo Finnzymes F-530L) para todas las PCR y se ejecutaron las reacciones de acuerdo con los protocolos del fabricante que se suministraron con la polimerasa. En particular, para la PCR primaria 1, se usaron 1 µl (10 µM) de cada uno de los cebadores pHPLT-BgIII-Fw y un cebador de mutagénesis inverso NNS y para la PCR primaria 2, se usaron 1 µl (10 µM) del cebador pHPLT-BgIII-Rv y un cebador de mutagénesis directo NNS. Cada reacción también incluyó 1 µl del ADN molde del plásmido pHPLT-GG36 (0,1-1 ng/µl). Se usó un termociclador Peltier PTC-200 de MJ Research para las PCR. Las reacciones produjeron dos fragmentos de aproximadamente 2 a 3 kb que tenían aproximadamente 30 nucleótidos superpuestos que rodeaban el codón de GG36 de interés. Los fragmentos obtenidos se fusionaron en una tercera PCR similar a las descritas anteriormente usando 1 µl de mezcla de reacción de PCR 1 primaria, 1 µl de mezcla de reacción de PCR 2 primaria y 1 µl (10 µM) de cada uno de los cebadores SacI-Fw y HindIII-Rv directos e inversos. Se purificó el fragmento lineal amplificado de 859 pb que codifica el gen de la variante GG36, (usando el kit de purificación PCR QIAGEN® Qiaquick) y se digirió con las enzimas de restricción SacI y HindIII para crear extremos cohesivos a ambos lados del fragmento de fusión. Después de la digestión con SacI y HindIII, también se purificaron aproximadamente 50 ng del plásmido pHPLT-GG36, dando como resultado un fragmento de la estructura del vector de 3,9 kb. El fragmento del vector digerido se ligó con 50 ng del fragmento digerido de 859 pb

que codifica la enzima variante, usando el ADN ligasa T4 (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante para la clonación de extremos cohesivos. Posteriormente, se usó la mezcla de ligación para transformar células de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoII E$, $degU Hy32$, $\Delta amyE::[xylR, pxyIA-comK]$), como se describe (documento WO 2002/014490).

- 5 Para expresar las proteínas variantes para análisis bioquímicos adicionales, las cepas de *B. subtilis* que portaban los plásmidos variantes de GG36 se inocularon en placas de microtitulación que contenían 150 μ l de medio de caldo Luria complementado con 10 μ g/ml de neomicina. Se cultivaron las placas durante la noche a 37 °C con agitación a 300 rpm y 80 % de humedad, usando tapas EnzyScreen para placas de microtitulación (EnzyScreen). Se usaron diez microlitros de la placa de cultivo durante la noche para inocular una nueva placa de microtitulación
- 10 que contenía 190 μ l de medio MBD (un medio definido basado en MOPS) con 10 μ g/ml de neomicina. Se preparó medio MBD esencialmente como es conocido en la técnica (véase Neidhardt y col., J. Bacteriol., 119: 736-747, [1974]), salvo que se omitieron NH_4Cl , $FeSO_4$ y $CaCl_2$ del medio base, se usó K_2HPO_4 3 mM y el medio de base se complementó con urea 60 mM y 100 ml de una solución compuesta por 210 g/l de glucosa y 350 g/l de maltodextrina. Los micronutrientes se prepararon como una solución madre 100X que contiene en un litro, 400 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 100 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 100 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 100 mg de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 100 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 10 ml de $CaCl_2$ 1 M y 10 ml de citrato sódico 0,5 M. Se incubaron las placas de microtitulación que contenían medio MDB durante 68 horas a 37 °C, 300 rpm y 80 % de humedad usando tapas EnzyScreen (EnzyScreen) para determinar la expresión proteica. Al día siguiente, los cultivos se filtraron a través de una placa de micro-filtrado (0,22 μ m; Millipore) y el filtrado resultante se usó para
- 20 análisis bioquímicos. Se llevaron a cabo los ensayos en micromuestras de tela de TCA, LAS/EDTA y SLT como se describe en la sección de Métodos de ensayo. Asimismo, se calcularon los índices de rendimiento como se describe en la descripción del ensayo SLT en la sección de Métodos de ensayo y se muestran en la Tabla 2-1.

- 25 TABLA 2-1: Valores del índice de rendimiento (IR) de las variantes de GG36 (solo como referencia) en relación con GG36 en el ensayo de micromuestras de SLT usando el Método de ensayo 3

Mutación en comparación con la Id. de sec. n.º 1 (numeración de BPN')	SLT, detergente del Ejemplo 26, 16C, IR
Q2S	1,1
V4R	1,1
V4S	1,1
R10S	1,1
P14K	1,1
A16S	1,1
T22A	1,1
T22R	1,1
S24R	1,2
G25V	1,1
V26F	1,1
L42I	1,2
P52F	1,2
P52E	1,1
P52N	1,1
N62E	1,1
N62Q	1,1
V68A	1,1
V68C	1,1
T71G	1,2
I72C	1,2
A74C	1,1
L75A	1,1
L75F	1,1
S78R	1,1
E89P	1,2
E89T	1,2
E89G	1,1
E89H	1,1
E89W	1,1
Y91N	1,3

ES 2 745 011 T3

K94N	1,1
G100S	1,1
S101A	1,2
S101N	1,1
S101G	1,1
S101D	1,1
S103G	1,3
S103N	1,2
V104L	1,1
V104I	1,1
A108I	1,1
L111V	1,5
E112V	1,2
G115K	1,1
N117F	1,1
V121F	1,1
S128D	1,2
S128F	1,1
S128L	1,1
S128N	1,1
P129E	1,1
L148I	1,1
A158E	1,1
G159E	1,1
S160D	1,2
S166D	1,2
N185E	1,1
R186H	1,1
S188E	1,2
S188D	1,1
V203E	1,2
Y209S	1,2
Y209N	1,2
Y209F	1,1
Y209T	1,1
Y209E	1,1
Y209H	1,1
Y209G	1,1
P210R	1,1
S212I	1,2
Y214F	1,1
A215N	1,1
A215D	1,1
A215E	1,1
L217E	1,1
L217N	1,1
T224A	1,1
A230E	1,1
A231I	1,1
Q236F	1,1
N238R	1,1
N238K	1,1
P239K	1,2
P239G	1,2

P239R	1,1
N248V	1,1
H249R	1,1
L250I	1,1
L262D	1,1
Y263F	1,1
S265F	1,1
L267V	1,2
L267N	1,1
N269I	1,1
E271I	1,1
E271H	1,1
A272F	1,2

TABLA 2-2: Valores del índice de rendimiento (IR) de las variantes de GG36 (solo como referencia) en relación con GG36 en el ensayo de micromuestras de SLT usando el detergente del Ejemplo 29

- 5 El índice de rendimiento de las variantes siguientes se ensayó usando el Método de ensayo 2 a 16 C (solo como referencia).

Mutaciones en comparación la con Id. de sec. n.º 1 (numeración de BPN^o)	PI
V4R	1,1
H17R	1,1
N18R	1,1
G20R	1,1
T22R	1,1
S24R	1,1
S24W	1,1
G25R	1,1
N43R	1,1
N43A	1,1
G46R	1,1
P52F	1,1
P52N	1,1
T57R	1,1
Q59A	1,1
N62Q	1,1
T71G	1,2
L75R	1,1
N76D	1,1
S78R	1,1
L82R	1,1
P86W	1,1
E89P	1,2
E89W	1,1
E89T	1,1
E89I	1,1
E89H	1,1
E89V	1,1
V104L	1,1
S106V	1,1
S106G	1,1
G115R	1,1
G118I	1,2
V121F	1,1
S144R	1,1

N185I	1,1
D197F	1,1
Y209N	1,1
Y209S	1,1
L217E	1,1
A231I	1,1
P239R	1,1
P239S	1,1
W241R	1,1
S242R	1,1
S242L	1,1
N243R	1,2
V244R	1,1
N248I	1,1
H249R	1,1
N252R	1,1
T253R	1,1
E271T	1,2
E271V	1,1
E271L	1,1
E271H	1,1
E271F	1,1
E271P	1,1

Ejemplo 32

Construcción y rendimiento de limpieza del conjunto NHJ1 y WCE1 de las variantes de GG36

El conjunto NHJ1 y WCE1 de las variantes de GG36 descrito en la presente memoria se construyó por ADN 2.0, Inc. (Menlo Park, CA) con sus métodos patentados, usando el plásmido de expresión pHPLT-GG36 de *B. subtilis* descrito anteriormente (Figura 2). Las variantes se expresaron en células de *B. subtilis* (genotipo: AaprE, AnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) como se describe en el Ejemplo 31 y se caracterizaron adicionalmente, usando los ensayos de micromuestras de tela de TCA y SLT como se describe en la sección de Métodos de ensayo.

Tabla 3-1: Valores del índice de rendimiento (IR) de las variantes de NHJ1 en relación con GG36 en el Método de ensayo 3

Mutaciones en comparación con la id de sec. n.º 1 (numeración de BPN')	IR determinados en detergente del Ejemplo 26 a 16 C
T022A-N062E	1,2
T022A-P129E	1,1
T022A-L111V	1,1
T022A-S188D	1,1
A016S-T022A	1,1
T022A-E089P	1,1
T022A-G159E	1,1
T022A-A158E	1,1

Ejemplo 33

Rendimiento de construcción y limpieza del conjunto NHJ4 de las variantes de GG36

El conjunto NHJ4 de las variantes de GG36 descritas en la Tabla 4-4 a continuación, se construyó usando el plásmido de expresión pHPLT-GG36 de *B. subtilis* (Figura 2) usando fusión por PCR o el kit QuikChange® de mutagénesis dirigida a múltiples sitios ("kit QCMS"; Stratagene) como se describe a continuación.

a) Construcción de variantes de NHJ4 por mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange® (QCMS)

Las variantes creadas por la mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange®, se muestran en la Tabla 4-4. El plásmido parental pHPLT-GG36 (ADN molde) se metiló usando dos microgramos de ADN y la metilasa Dam (New England Biolabs), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los mutantes de sitio dirigido se fabricaron mediante un kit QuikChange® de mutagénesis dirigida a múltiples sitios (“kit QCMS”; Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante (véase la Tabla 4-1 para las secuencias de iniciadores). Para una transformación eficiente de *B. subtilis*, se amplificó el ADN de la reacción QCMS mediante amplificación en círculo rodante (RCA) usando el kit Illustra Templiphi (GE Healthcare) según el protocolo del fabricante. Se usó un microlitro de ADN amplificado diluido 10 veces para transformar 50 µl de células competentes de *B. subtilis* (genotipo: AaprE, AnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). La mezcla de transformación se agitó a 37 °C durante 1 hora. Se sembraron alícuotas de diez microlitros de la mezcla de transformación sobre placas de agar Luria descremada (1,6 %) complementadas con 10 µg/ml de neomicina. Posteriormente, se inocularon las colonias con halos en 120 µl de medio de caldo Luria que contenía 10 µg/ml de neomicina, para la extracción de ADN plasmídico (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Los plásmidos extraídos se secuenciaron para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas.

Tabla 4.1 Secuencias de cebadores usadas en la construcción de variantes de NHJ4 con el método QCMS		
Mutaciones introducidas (numeración de BPN')	Nombre de cebador	Secuencia del cebador (5'-fosforilado)
S101A S103G V104L	P5939	AAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTGGACTTAGCTCGATTGCC CAAGGATTG (Id. de sec. n.º 5)
G159E	P5940	CATCTGGAAATTCAGGTGCAGAATCAATCAGCTATCCGGCCCGTTA (Id. de sec. n.º 6)
T22A	P5941	CTGCCCATACCGTGGATTGGCAGGTTCTGGTGTAAGTTGCTG (Id. de sec. n.º 7)
Y209E	P5942	AGGTGTAAACGTGCAGAGCACAGAACCAGGTTCAACGTATGCCAG (Id. de sec. n.º 8)
E271F	P5943	GAAGCGGACTTGTCAATGCATTCGCTGCAACTCGTTAAAGCTTG (Id. de sec. n.º 9)
S101A	P5944	AAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTTCGGTCAGCTCGATTGCC CAA (Id. de sec. n.º 10)
S103G	P5945	TATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGTGGAGTCAGCTCGATTGCCAAG GA (Id. de sec. n.º 11)
L111V	P5946	GTCAGCTCGATTGCCAAGGAGTAGAATGGGCAGGGAACAATGG CA (Id. de sec. n.º 12)
S128N	P5947	CGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAACCCTTCGCCAAGTGCCACACTT GA (Id. de sec. n.º 13)
N62E	P5948	GAACCATCCACTCAAGATGGGGAAGGGCATGGCACGCATGTG (Id. de sec. n.º 14)
S188D	P5949	ACCAAAACAACAACCGCGCCGACTTTTCACAGTATGGCGCAGGGC TT (Id. de sec. n.º 15)

b) Construcción de variantes de NHJ4 por extensión PCR

Se crearon diez mutantes combinatorios de GG36 por PCR de extensión (Tabla 4-4). La lista de mutaciones introducida en el plásmido pHPLT-GG36 y los cebadores usados para este fin se muestran en la Tabla 4-2. Para crear cada mutante, se amplificaron varios fragmentos (Tabla 4-3) mediante los cebadores que se muestran en la Tabla 4-2. Cada reacción de amplificación por PCR contenía 30 pmol de cada cebador y 100 ng del molde de ADN y el plásmido de pHPLT-GG36. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando ADN polimerasa Vent (New England Biolabs). La reacción de PCR (20 µl) se calentó inicialmente a 95 °C durante 2,5 min seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 s, recocido a 55 °C durante 15 s y extensión a 72 °C durante 1 min. Después de la amplificación, se purificaron en gel de 2 a 4 fragmentos de la PCR (Tabla 4-3) para cada variante, usando un kit de purificación QIAGEN® de bandas de gel y se mezclaron (50 ng de cada fragmento). Estas mezclas sirvieron como moldes de ADN para la PCR de extensión mediante los cebadores P5954 y P5955 para generar el fragmento génico de longitud completa. Las condiciones de la PCR fueron las mismas que las descritas anteriormente, excepto la fase de extensión, que se llevó a cabo a 72 °C durante 2 min. El fragmento de ADN de longitud completa se purificó en gel utilizando un kit de purificación QIAGEN® de bandas de gel, digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI e *Hind*III y se ligó con el vector pHPLT-GG36 digerido con las mismas enzimas de restricción. Las mezclas de ligación se amplificaron usando amplificación en círculo rodante y se transformaron en células de *B. subtilis* como se describe para el método QCMS anterior. Las variantes de GG36 obtenidas se secuenciaron para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas. Las variantes creadas por la PCR de extensión se muestran en la Tabla 4-4.

TABLA 4-2: Listado de cebadores usados para la construcción de variantes NHJ4 con PCR de extensión			
Mutación (numeración de BPN')	Nombre del cebador	Directo o inverso	Secuencia de cebador

	P5950 flanqueante	Directo	CATATGAGTTATGCAGTTTGTAG (ld. de sec. n.º 16)
	P5951 flanqueante	Inverso	TGTTTTTCTTGAATTGTGCTGT (ld. de sec. n.º 17)
	P5954 flanqueante	Directo	CAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTG (ld. de sec. n.º 18)
	P5955 flanqueante	Inverso	GACAAGGTAAAGGATAAAACAGC (ld. de sec. n.º 19)
T22A	P5956	Directo	CATAACCGTGGATTGGCAGGTTCT GGTGTAAGATTGCTG (ld. de sec. n.º 20)
T22A	P5957	Inverso	ACTTTTACACCAGAACCTGCCAAT CCACGGTTATGGGCAG (ld. de sec. n.º 21)
S103G	P5960	Directo	GCGAGCGGTTTCAGGTGGAGTCAG CTCGATTGCCCCAAGGA (ld. de sec. n.º 24)
S103G	P5961	Inverso	TGGGCAATCGAGCTGACTCCACCT GAACCGCTCGCCCCA (ld. de sec. n.º 25)
S103G L111V	P5962	Directo	GTGGAGTCAGCTCGATTGCCAAG GAGTAGAATGGGCAGGGAACAATGGCAT (ld. de sec. n.º 26)
S103G L111V	P5963	Inverso	CATTCTACTCCTTGGGCAATCGAG CTGACTCCACCTGAACCGCTCGCCCCA (ld. de sec. n.º 27)
S101G S103A V104I	P5964	Directo	GCGAGCGGTGGAGGTGCGATCAGCTC GATTGCCCAAGGATTG (ld. de sec. n.º 28)
S101G S103A V104I	P5965	Inverso	CTTGGGCAATCGAGCTGATCGCACCT CCACCGCTCGCCCCAATACTTTA (ld. de sec. n.º 29)
S101A S103G V104L	P5966	Directo	GCGAGCGGTGCAGGTGACTTAGCTC GATTGCCCAAGGATTG (ld. de sec. n.º 30)
S101A S103G V104L	P5967	Inverso	CTTGGGCAATCGAGCTAAGTCCACCT GCACCGCTCGCCCCAATACTTTA (ld. de sec. n.º 31)
S101A	P5968	Directo	TATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTTCCG TCAGCTCGATTGC (ld. de sec. n.º 32)
S101A	P5969	Inverso	ATCGAGCTGACCGAACCTGCACCGCTC GCCCCAATACTTTA (ld. de sec. n.º 33)
S128N	P5970	Directo	CTAATTTGAGTTTAGGAAACCTTCGC CAAGTGCCACACTT (ld. de sec. n.º 34)
S128N	P5971	Inverso	GCACTTGGCGAAGGTTTCCTAAACTC AAATTAGCAACGTG (ld. de sec. n.º 35)
G159D	P5972	Directo	GAAATTCAGGTGCAGACTCAATCAGCT ATCCGGCCCCGTT (ld. de sec. n.º 36)
G159D	P5973	Inverso	GGATAGCTGATTGAGTCTGCACCTGAA TTCCAGATGC (ld. de sec. n.º 37)
G159E	P5974	Directo	GAAATTCAGGTGCAGAATCAATCAGCT ATCCGGCCCCGTT (ld. de sec. n.º 38)
G159E	P5975	Inverso	GGATAGCTGATTGATTCTGCACCTGAAT TTCCAGATGC (ld. de sec. n.º 39)
Y209E	P5976	Directo	AACGTGCAGAGCACAGAACCGGTTCA ACGTATGCCAGCTT (ld. de sec. n.º 40)
Y209E	P5977	Inverso	CATACGTTGAACCTGGTTCTGTGCTCTG CAGTTTACACC (ld. de sec. n.º 41)
L111V	P5978	Directo	TCGATTGCCCAAGGAGTAGAATGGGCA GGGAACAATGGCAT (ld. de sec. n.º 42)
L111V	P5979	Inverso	CATTGTTCCCTGCCCATTCTACTCCTTGG GCAATCGAGCTGAC (ld. de sec. n.º 43)

TABLA 4-3: Variantes combinatorias creadas por PCR de extensión

Variante n.º	Variantes (numeración de BPN)	Fragmento	Fragmentos PCR1
NHJ4-1	S101G S103A V104I	1 2	P5950+P5965 P5964+P5951
NHJ4-2	S101G S103A V104I G159D	3 4 5	P5950+P5965 P5964+P5973 P5972+P5951
NHJ4-3	S101A S103G V104L	6	P5950+P5967

		7	P5966+P5951
NHJ4-4	S101A S103G V104L G159E	8 9 10	P5950+P5967 P5966+P5975 P5974+P5951
NHJ4-5	S101A S103G V104L T22A	11 12 13	P5950+P5957 P5956+P5967 P5966+P5951
NHJ4-10	T22A S101A Y209E	14 15 16 17	P5950+P5957 P5956+P5969 P5968+P5977 P5976+P5951
NHJ4-12	T22A S103G G159E	21 22 23 24	P5950+P5957 P5956+P5961 P5960+P5975 P5974+P5951
NHJ4-20	S101A S103G V104L S128N	29 30 31	P5950+P5967 P5966+P5971 P5970+P5951

Para expresar el conjunto NHJ4 de proteínas variantes para análisis bioquímicos adicionales, las cepas de *B. subtilis* que portaban los plásmidos variantes, se inocularon en placas de microtitulación que contenían 150 µl de medio de caldo Luria complementado con 10 µg/ml de neomicina. Los cultivos se cultivaron para la expresión de proteínas como se describe en el Ejemplo 31 y se filtraron a través de una placa de microfiltro (0,22 µm; Millipore), también como se describe en el Ejemplo 31. El filtrado resultante se usó para análisis bioquímicos. El ensayo de inhibición de eglina C para la determinación del contenido de proteína y los ensayos de micromuestras de tela de SLT probados en diversos detergentes se llevaron a cabo como se describe en la sección de Métodos de ensayo. Los índices de rendimiento se calculan también como se describe en la descripción del ensayo de micromuestras de tela de SLT en la sección de Métodos de ensayo.

TABLA 4-4: Variantes de mutación múltiple de NHJ4. Índice de rendimiento (IR) en relación con GG36 (determinado por el Método de ensayo 3 - detergente del Ejemplo 26, 16C)		
Mutaciones en comparación con la id de sec. n.º 1 (numeración de BPN')	PI	Nombre de la variante (método para la construcción)
T22A-L111V-G159E	1,4	NHJ4-13 (QCMS)
T22A-S103G-G159E	1,2	NHJ4-12 (PCR de extensión)
T22A-S128N-E271F-Y209E	1,2	NHJ4-14 (QCMS)
T22A-Y209E-E271F	1,2	NHJ4-7 (QCMS)
T22A-S101A-Y209E	1,1	NHJ4-10 (PCR de extensión)
T22A-L111V-S128N	1,1	NHJ4-17 (QCMS)
T22A-S101A-G159E	1,1	NHJ4-24 (QCMS)
T22A-S101A-S103G-V104L	1,1	NHJ4-5 (PCR de extensión)

Ejemplo 34

Capacidad limpiadora y de construcción del conjunto NHJ3 de las variantes de GG36

El conjunto NHJ3 de variantes descrito en la presente memoria, se basa en una variante de GG36 (denominada GG36-9) que contiene las siguientes mutaciones: S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q236H, Q245R, N248D y N252K (numeración de BPN'). Estas variantes se crearon usando el kit QuikChange® Lightning de mutagénesis dirigida a múltiples sitios (kit QCLMS; Stratagene), con el plásmido pRA68 (véase la Figura 3) como molde de ADN. El plásmido pRA68 se derivó del vector pBN3 (véase Babe y col., Biotech. Appl. Biochem. 27:117-124 [1998]).

A continuación, se proporciona la secuencia de ADN de la variante GG36-9 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, el propéptido en minúsculas con texto subrayado y la secuencia madura de GG36-9 en letras mayúsculas):

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgctcgctgaccgcactactcatttctgttcttttagttcatcgatcgatcgctgctgaggaagcaaaaagaaaaatatttaattgg
ctttaatgagcaggaagctgctcagtgagttttagaacaagtagagggcaaatgacgaggtcgccattctctgaggaagaggaagtcgaattgaattgcttcattgaatt
gaaacgattctctgtttatccgttgagtttaagcccagaagatgtgacgccttgactcgatccagcgatttcttatattgaagaggtgcagaagtaacgacaatgGCG
CAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGCTGCCCATTAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTA
AAAGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCAATCATCCAGACTTAAATATTTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACAG
GGGAACCATCCAATCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACAATTTCGA
TTGGCGTACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGGGGGCGCC
ATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTGGGAAGC
CCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCT

GGAAATTCGGGTGCAGACTCAATCAGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAA
 AACAAACACCGCGCCAGCTTTTACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATCGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGC
 ACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGTCC
 TTGTTAAACATAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACGAATCCGCGATCATCTAAAGAAAACGGCAACGAGCTTAGG
 AAGCACGAACCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCCGAAGCTGCAACTCGTTAA (Id. de sec. n.º44)

A continuación, se proporciona la secuencia de proteínas de la variante de GG36-9 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, el propéptido en minúsculas con texto subrayado y la secuencia de proteasa madura de GG36-9 en letras mayúsculas):

vrskklwivastallsvafssiasaeeakekyliqfnegeavsefveqveandevailseeeveieillhefetipV1svelspedvdaleldpaisyieedaevt
 tmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGSVKVAV1DTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNHGHGTHVAGTIAALN
 NSIGV1GVAPSAELYAVKV1GASGGGAISSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGV1VVAA
 SGNSGADSIYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAA
 V1VKHKNPSWSNVRIRDHLKKTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR (Id. de sec. n.º 45)

Para crear las variantes de NHJ3 usando el kit QCLMS, se diseñaron cebadores mutagénicos como se muestra en la Tabla 5-1 para cada una de las variantes. La reacción de mutagénesis para cada variante consistió en 0,5 µl de ADN de plásmido pRA68 (168 ng/µl), 0,5 µl de iniciador mutagénico “f” directo (25 µM), 0,5 µl de iniciador mutagénico “r” inverso (25 µM), 1 µl de dNTP (suministrado en el Kit QCLMS), 1,5 µl de solución Quik (suministrada en el kit QCLMS), 1 µl de mezcla enzimática (suministrada en el kit QCLMS) y 39,5 µl de agua destilada y desionizada para obtener un volumen de reacción de 50 µl según las instrucciones del fabricante. El programa de ciclos fue de 1 ciclo a 95 °C durante 2 minutos, 18 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 68 °C durante 3 minutos, 22 segundos y un ciclo final de 68 °C durante 5 minutos. A continuación, se usó 1 µl de la enzima de restricción DpnI suministrada en el kit para digerir el ADN del plásmido en la reacción y a continuación, se usaron 2 µl de la reacción para transformar células TOP 10 competentes de *E.coli* (Invitrogen). Los transformantes de *E.Coli* se seleccionaron en placas LB que contenían 50 ug/ml (ppm) de carbenicilina después del crecimiento durante la noche a 37 °C. El ADN plasmídico se extrajo de las 4-8 colonias de *E. coli* cultivadas en un medio LA que contenía 50 ug/ml (ppm) de carbenicilina usando el kit QIAprep spin miniprep (Qiagen). Los plásmidos se secuenciaron para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas. Los plásmidos variantes se transformaron a continuación en células de *B. subtilis* como se describe en el Ejemplo 31. Las cepas variantes de *B. subtilis* se cultivaron como se describe en el Ejemplo 31 para un análisis bioquímico adicional, tal como la determinación del contenido de proteína usando el ensayo de inhibición de eglina c (sección de Métodos de ensayo) y el ensayo de limpieza de micromuestras de SLT (sección de Métodos de ensayo). La capacidad limpiadora de las variantes de NHJ3 se muestra en las Tablas 5-2 y 5-3.

TABLA 5-1: Lista de iniciadores mutagénicos usados para crear el conjunto NHJ3 de variantes (* “f” se refiere al iniciador directo y “r” se refiere al iniciador inverso)

Variante	Mutación incorporada (numeración de BPN')	Nombre del iniciador mutagénico	Secuencia de iniciadores mutagénicos 5' a 3'
NHJ3-1	G101S	p138_G101S f*	GTATTAGGGGCGAGCGGTGGCGGCGCCATCAGCTCGATTGC (Id. de sec. n.º46)
		p139_G101S r*	GCAATCGAGCTGATGGCGCCGCCACCGCTCGCCCTTAATAC (Id. de sec. n.º47)
NHJ3-2	A103S	p140_A1013 f	GGGGCGAGCGGTGGGGCGGGCATCAGCTCGATTGCCAAG (Id. de sec. n.º48)
		p141_A1013 r	CTTGGGCAATCGAGCTGATGCCGCCCCACCGCTCGCCCC (Id. de sec. n.º49)

TABLA 5-1: Lista de iniciadores mutagénicos usados para crear el conjunto NHJ3 de variantes (* “f” se refiere al iniciador directo y “r” se refiere al iniciador inverso)

Variante	Mutación incorporada (numeración de BPN')	Nombre del iniciador mutagénico	Secuencia de iniciadores mutagénicos 5' a 3'
NHJ3-3	I104V	p142_1104Vf	GGGCGAGCGGTGGGGCGCCGTTAGCTCGATTGCCAAGGATTG (Id. de sec. n.º 50)
		p143_1104Vr	CAATCCTTGGGCAATCGAGCTAACGGCGCCCCCAACGCTCGCCC (Id. de sec. n.º 51)
NHJ3-4	D159G	p144_D159Gf	GCATCTGGAATTCGGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCCGT (Id. de sec. n.º 52)
		p145_D159G r	ACGGGCCGGATAGCTGATTGAGCCTGCACCCGAAITTCAGATGC (Id. de sec. n.º 53)

NHJ3-5	V232A	p146_V232Af	CTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCACTTGTTAAACAT AAGAACCC (Id. de sec. n.º 54)
		p147_V232Ar	GGGTTCTTATGTTTAAACAAGTGCTGCTGCACCTGC AACATGAG (Id. de sec. n.º 55)
NHJ3-6	H236Q	p148_H236Qf	GTGCAGCAGTCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATC TTGGTCCAAT (Id. de sec. n.º 56)
		p149_H236Qr	ATTGGACCAAGATGGGTTCTTTGTTTAAACAAGG ACTGCTGCAC (Id. de sec. n.º 57)
NHJ3-7	1Z245Q	p150_R245Qf	CCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCGATCATC TAAAGAAAAC (Id. de sec. n.º 58)
		p151_R245Qr	GTTTTCTTTAGATGATCGCGGATTTGTACATTGG ACCAAGATGG (Id. de sec. n.º 59)

TABLA 5-1: Lista de iniciadores mutagénicos usados para crear el conjunto NHJ3 de variantes (* “f” se refiere al iniciador directo y “r” se refiere al iniciador inverso)

Variante	Mutación incorporada (numeración de BPN')	Nombre del iniciador mutagénico	Secuencia de iniciadores mutagénicos 5' a 3'
NHJ3-8	D248N	P152_D248Nf	GGTCCAATGTACGAATCCGCAATCATCTAAAGA AAACGGCAAC (Id. de sec. n.º 60)
		P153_D248Nr	GTTGCCGTTTTCTTTAGATGATTGCGGATTCGTA CATTGGACC (Id. de sec. n.º 61)
NHJ3-9	K252N	P154_K252Nf	GAATCCGCGATCATCTAAAGAATACGGCAACGA GCTTAGGAAG (Id. de sec. n.º 62)
		P155_K252Nr	CTTCCTAAGCTCGTTGCCGTATTCTTTAGATGATC GCGGATTC (Id. de sec. n.º 63)

Ejemplo 35

Rendimiento de construcción y limpieza del conjunto NHJ5 de las variantes de GG36

5

El conjunto NHJ5 de variantes descrito en la presente memoria, se basa en una variante de GG36 (denominada GG36-7) que contiene las siguientes mutaciones: S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q245R, N248D (numeración de BPN'). Estas variantes se crearon como se describe en el Ejemplo 34 usando el kit QuikChange® Lightning de mutagénesis dirigida a múltiples sitios (kit QCLMS; Stratagene) con el plásmido pRA96 como el molde de ADN (Figura 4; el plásmido pRA96 se derivó del vector pBN3, que se describe en Babe y col., Biotech. Appl. Biochem. 27:117-124, 1998). Las mutaciones incorporadas y las secuencias de los cebadores usados para introducir las mutaciones en GG36-7 se muestran en la Tabla 6-1. Las variantes se generaron usando los métodos descritos en el Ejemplo 34. Las cepas de las variantes de *B. subtilis* se cultivaron como se describe en Ejemplo 31 para un análisis bioquímico adicional, tal como la determinación del contenido de proteína usando el ensayo de inhibición de eglina c (sección de Métodos de ensayo) y el ensayo de limpieza de micromuestras de SLT (sección de Métodos de ensayo). La capacidad limpiadora del conjunto NHJ5 de variantes se muestra en las Tablas 6-2 y 6-3.

15

Id. de sec. n.º 64 Secuencia de ADN de la variante de GG36-7 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, el péptido en minúsculas con texto subrayado y la secuencia de proteasa madura de GG36-7 en letras mayúsculas)

20

Gtgagaagcaaaaaattgtgatcgctgcgctgaccgcactactcatttctgttgccttttagttcatcgatcgcatcggtgctgaagaagcaaaagaaaaataatatt
ggcttaaatgagcaggaagctgtcagtgagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctgaggaagaggaagtcgaaattgaattgctcat
gaatttgaacgattcctgtttatccgttgagttgaagccagaaagatgtgacgcgcttgaactcgatccagcgatttcttatattgaagagatgcagaaagtaacgac
aatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGCTGCCCATAAACCGTGGATTGACAGGTT
25 CTGGTGTAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCT
TTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCT
AAACAATTCGATTGGCGTACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACCTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCG
GTGGGGGCGCCATCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTT
GAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTG
30 TTGAGCTGGCATCTGGAATTCGGGTGCAGACTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTC
GGAGTACTGACCAAAACAACCGCGCCAGCTTTTACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATCGTTCGACACCAG
GTGTAAACGTGCAGAGCACATAACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCAT
GTTGCAGGTGCAGCAGTCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACGAATCCGCGATCATCTAAAG
AATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACCTTGATGGAAGCGGACTTGTCATGCCGAAGCTGCAACTCGT

Id. de sec. n.º 65 Secuencia de ADN de la variante de GG36-7 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, el péptido en minúsculas con texto subrayado y la secuencia de proteasa madura de GG36-7 en letras mayúsculas)

5 vrskkIwivastallisvafssiasaaeeeakekylligfnegeavsefveqveandevailseeeveieillhefetipV1svelspedvdaleldpaisyieedaevt
 tmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSgvkvAV1DTGISTHPDLNIRGGASfVPGEPSTQDGNGHGTHVAGTIAALN
 NSIGV1GVAPSAELYAVKV1GASGGGAISSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGV1VVAA
 SGNSGADSIYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAA
 V1VKQKNPSWSNVRI RDHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR

10

Tabla 6-1: Lista de cebadores usados para crear el conjunto NHJ5 de variantes		
Cebador n.º	Mutaciones usadas de la numeración de GG36 (numeración de BPN' mostrada en paréntesis)	Secuencia del iniciador
168	H243R (H249R)	GTACGAATCCGCGATAGACTAAAGAATACGGCAACG AG (Id. de sec. n.º 66)
170	E265F (E271F)	GCGGACTTGTCAATGCCTTTGCTGCAACTCGTTAAAG CTTACAT (Id. de sec. n.º 67)
172	D157E (D159E)	GGAAATTCGGGTGCAGAATCAATCAGCTATCCGGCC CGTTA (Id. de sec. n.º 68)
174	A156E (A158E)	CTGGAAATTCGGGTGAAGACTCAATCAGCTATCCGG CC (Id. de sec. n.º 69)
176	A156E-D157G (A158E- D159E)	CGGCATCTGGAAATTCGGGTGAAGGCTCAATCAGCT ATCCGGCCCGTTATG (Id. de sec. n.º 70)
178	T22A	CATAACCGTGGATTGGCAGGTTCTGGTGTAAAAGTT GCTGTC (Id. de sec. n.º 71)
180	N60E (N62E)	TCCACTCAAGATGGGGAAGGGCATGGCACGCATGTG GC (Id. de sec. n.º 72)
182	N232R (N238R)	CTTGTTAAACAAAAGAGACCATCTTGGTCCAATGTAC GAATC (Id. de sec. n.º 73)
186	T247R (T253R)	AATGTACGAATCCGCAGACATCTAAAGAATACGGCAA CGAGC (Id. de sec. n.º 74)
188	S24R	CGATCATCTAAAGAATAGCAACGAGCTTAGGAAG CACGAAC (Id. de sec. n.º 75)
190	N74D (N76D)	GTGGATTGACAGGTAGAGGTGTAAAAGTTGCTGTCC TCGATA (Id. de sec. n.º 76)

TABLA 6-2: Capacidad limpiadora de las variantes de NHJ5 con el Método de ensayo 3. Índice de rendimiento (IR) en relación con GG36.

Mutaciones en comparación con la id de sec. n.º 1 (numeración de BPN')	PI	Nombre de la variante
T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R	1,3	NHJ5-11
T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	1,3	NHJ5-12

15

Ejemplo 36

La Tabla (6-4) a continuación ejemplifica las concentraciones de detergente y tampones usadas, mientras que los Ejemplos 36a-36n muestran los tipos de detergentes usados.

20

TABLA 6-4: Concentraciones finales de detergente, de dureza del agua y de tampón usadas para los ensayos de micromuestras de SLT			
Composición detergente	Concentración final de detergente (g/l)	Dureza final del agua* (gpg)	Concentración final de tampón de carbonato de sodio (mM)
36a	0,75	6	2
36b	0,808	6	2
36c	0,808	6	2
36d	2,25	12	2
36e	1	3	2
36f	1,2	12	2
36g	3,96	12	2

36h	7,69	20	2
36i	5	10	2
36j	7,69	20	2
36k	7,69	20	2
36l	6,15	10	2
36m	7,69	20	2
36n	6,15	20	2

Las siguientes son composiciones detergentes granulares para el lavado de ropa. La proteasa de esta invención se añade por separado a estas formulaciones.

	36a	36b	36c	36d	36e
Tensioactivos					
No iónico C ₁₀				0,1843	
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	3,53	3,53	3,53		
Alquil C ₁₂₋₁₄ sulfato					
Sulfonato de alquilbenceno lineal de sodio con una longitud de cadena alifática de C ₁₁ -C ₁₂	8,98	8,98	8,98	13,58	14,75
Alcohol etoxi C _{14 15} - 3- sulfato de sodio	1,28	1,28	1,28		
Alquil C _{14/15} sulfato de sodio	2,36	2,36	2,36		
Etoxilado de alcohol C _{14/15} con un promedio de etoxilación de 7 moles					
Cloruro de mono-alkil C ₈₋₁₀ mono-hidroxi-etil-dimetil-amonio cuaternario					
Cloruro de dimetil-hidroxi-etil-lauril-amonio				0,1803	
Zeolita A	15,31	15,31	15,31		4,47
Bentonita				8,35	
Silicato de sodio a una relación de 1,6					0,16
Silicato de sodio a una relación de 2,0	3,72	3,72	3,72	8,41	
Silicato de sodio a una relación de 2,35					
Ácido cítrico				0,0066	
Tripolifosfato de sodio				5,06	
Carbonato sódico	26,1	26,18	26,1	15,9	29,0
Nonanoiloxibencenosulfonato	5,78	5,78	5,78	1,17	1,86
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina	0,037	0,037	0,037		
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio					
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metileno fosfónico)	0,62	0,62	0,62		
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico					
Tetraacetato de etilendiamina				0,2701	
MgSO ₄	0,056	0,056	0,056	0,47	
Percarbonato de sodio		7,06	7,06		3,64
Tetraacetil etilendiamina					
Perborato de sodio monohidratado				1,47	
Carboximetilcelulosa (p. ej., FinnFix BDA de CPKelco)	0,38	0,38	0,38	0,173	
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (70/30) de sodio	3,79	3,78	3,79		3,64
Poliacrilato sódico (Sokalan PA30 CL)	3,78	3,78	3,78	0,842	
Polímero de tereftalato					
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo				0,89	
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc					
Abrillantador fluorescente C.I. 260	0,1125	0,1125	0,1125	0,043	0,15
Abrillantador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)				0,0952	
Gránulo supresor de las jabonaduras	0,015	0,015	0,015		0,031
Carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente (Finnifix ® SH-1)					

Bentonita					
Misceláneos (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

	36f	36g	36h	36i	36j
Tensioactivos					
No iónico C ₁₀	0,1142	0,2894	0,1885	0,1846	0,1885
Alquil C ₁₆₋₁₇ sulfato ramificado					
Alquil C ₁₂₋₁₄ sulfato					
Sulfonato de alquilbenceno lineal de sodio con una longitud de cadena alifática de C ₁₁ -C ₁₂	12,94	15,69	9,01	8,42	9,51
Alcohol etoxi C _{14 15} - 3- sulfato de sodio					
Alquil C _{14/15} sulfato de sodio					
Etoxilado de alcohol C _{12/14} con un promedio de etoxilación de 7 moles	2,9				
Etoxilado de alcohol C _{12/14} con un promedio de etoxilación de 3 moles				2,44	
Etoxilado de alcohol C _{14/15} con un promedio de etoxilación de 7 moles			0,97	1,17	0,97
Cloruro de mono alquil C ₈₋₁₀ mono-hidroxietil-dimetil-amonio cuaternario			0,45		
Cloruro de dimetil-hidroxil-etil-lauril-amonio		0,195			0,45
Zeolita A	2,01	0,39	1,83	2,58	0,59
Silicato de sodio a una relación de 1,6			4,53	5,62	4,53
Silicato de sodio a una relación de 2,0		10,1			
Silicato de sodio a una relación de 2,35	7,05				
Ácido cítrico			1,4	1,84	1,0
Tripolifosfato de sodio		5,73			
Carbonato sódico	12,65	15,93	21,0	27,31	20,2
Nonanoiloxibencenosulfonato		1,73			
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina			0,0168	0,0333	0,024
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio					
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metilen fosfónico)			0,327		0,3272
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico			0,45	0,2911	0,45
Tetraacetato de etilendiamina		0,28		0,1957	
MgSO ₄		0,54	0,79	0,6494	0,793
Percarbonato de sodio			19,1	15,85	22,5
Tetraacetil etilendiamina			4,554	3,71	5,24
Perborato de sodio monohidratado		5,55			
Carboximetilcelulosa (p. ej., FinnFix BDA de CPKelco)	0,62	0,21	0,23	1,07	0,2622
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (70/30) de sodio	0,40	2,61	2,5	2,00	1,75
Poliacrilato sódico (Sokalan PA30 CL)			0,0055	0,011	0,008
Polímero de tereftalato				0,231	
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo	0,55	1,40	0,911	0,8924	0,911
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc					
Abrillantador fluorescente C.I. 260	0,1174	0,048	0,1455	0,2252	0,1455
Abrillantador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)		0,1049			
Gránulo supresor de las jabonaduras			0,04	0,0658	0,04
Carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Misceláneos (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

	36k	36l	36m	36n	
--	-----	-----	-----	-----	--

Tensioactivos					
No iónico C ₁₀	0,1979	0,1979	0,1979	0,1979	
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇					
Alquil C ₁₂₋₁₄ sulfato					
Sulfonato de alquilbenceno lineal de sodio con una longitud de cadena alifática de C ₁₁ -C ₁₂	8,92	8,92	11,5	11,5	
Alcohol etoxi C _{14/15} - 3 - sulfato de sodio	1,62	1,62	1,125	1,125	
Alquil C _{14/15} sulfato de sodio					
Etoxilado de alcohol C _{14/15} con un promedio de etoxilación de 7 moles	1,0	1,0	1,5	1,5	
Cloruro de mono alquil C ₈₋₁₀ mono-hidroxietil-dimetil-amonio cuaternario					
Cloruro de dimetil-hidroxil-etil-lauril-amonio					
Zeolita A	1,63	1,63	2,0	2,0	
Silicato de sodio a una relación de 1,6	4,75	4,75	4,75	4,75	
Silicato de sodio a una relación de 2,0			0,06	0,06	
Silicato de sodio a una relación de 2,35					
Ácido cítrico	1,10	1,10	1,1	1,1	
Tripolifosfato de sodio					
Carbonato sódico	23,3	23,3	23,3	23,3	
Nonanoiloxibencenosulfonato					
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina	0,021	0,021	0,015	0,015	
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio	0,26	0,26	0,26	0,26	
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metilen fosfónico)					
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico	0,47	0,47	0,47	0,47	
Tetraacetato de etilendiamina					
MgSO ₄	0,83	0,83	0,82	0,82	
Percarbonato de sodio	19,35	19,35	19,35	19,35	
Tetraacetil etilendiamina	4,51	4,51	4,51	4,51	
Perborato de sodio monohidratado					
Carboximetilcelulosa (p. ej., FinnFix BDA de CPKelco)	1,01	1,01	1,01	1,01	
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (70/30) de sodio	1,84	1,84	1,84	1,84	
Poliacrilato sódico (Sokalan PA30 CL)	0,007	0,007	0,005	0,005	
Polímero de tereftalato	0,179	0,179	0,179	0,179	
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo	0,96	0,96	0,96	0,96	
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc					
Abrillantador fluorescente C.I. 260	0,153	0,153	0,171	0,171	
Abrillantador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)					
Gránulo supresor de las jabonaduras	0,042	0,042	0,042	0,042	
Carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Misceláneos (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Notas para los Ejemplos 36 a-n:

- 5 Los ingredientes tensioactivos pueden obtenerse de BASF, Ludwigshafen, Alemania (Lutensol®); Shell Chemicals, Londres, Reino Unido; Stepan, Northfield, Illinois, Estados Unidos; Huntsman, Huntsman, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos; Clariant, Sulzbach, Alemania (Praepagen®).

La zeolita puede obtenerse de Industrial Zeolite (UK) Ltd, Grays, Essex, Reino Unido.

- 10 El ácido cítrico y el citrato de sodio pueden obtenerse de Jungbunzlauer, Basilea, Suiza.

El percarbonato sódico, el carbonato sódico, el bicarbonato sódico y el sesquicarbonato sódico pueden obtenerse de Solvay, Bruselas, Bélgica.

Los copolímeros de acrilato/maleato se pueden obtener de BASF, Ludwigshafen, Alemania.

La carboximetilcelulosa y carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente se pueden obtener de CPKelco, Arnhem, Países Bajos. El abrillantador fluorescente

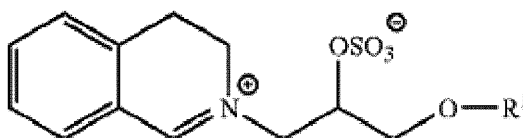
C.I. 260 se puede obtener de 3V Sigma, Bergamo, Italia como Optiblanco® Optiblanco® 2M/G, Optiblanco® 2MG/LT Extra u Optiblanco® Ecobright.

El etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio se puede obtener de Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido.

El copolímero de tereftalato puede obtenerse de Clariant con el nombre comercial Repelotex SF 2.

El ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico puede obtenerse de Thermphos, Vlissingen -Oost, Países Bajos.

El reforzador de blanqueo basado en oxaziridinio tiene la siguiente estructura, en donde R1 = 2-butiloctilo, y se produjo según el documento US-2006/0089284A1.



Las enzimas Natalase®, Termamyl®, Stainzyme Plus®, Celluclean® y Mannaway®, se pueden obtener de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.

El tetrasulfonato de ftalocianina de zinc se puede obtener de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza, como Tinolux® BMC.

El gránulo supresor de espuma se puede obtener de Dow Corning, Barry, Reino Unido.

El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de óxido de polietileno injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

Ejemplo 37

Construcción de la biblioteca combinatoria NHJ2

Este ejemplo describe la construcción de una biblioteca combinatoria de GC36 mediante una o más de las siguientes mutaciones: A016S, T022A, S101A, S103G, V104L, L111V, S128N, y L148I (numeración de BPN'). El plásmido de expresión pHPLT-GG36 de *B. subtilis* se proporcionó para el ADN 2,0 Inc., para la generación de la biblioteca combinatoria NHJ2. Se proporcionó una reacción de ligación de la biblioteca NHJ2 construida por ADN 2,0 Inc. para la transformación en la cepa de *B. subtilis* (genotipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Las variantes generadas que contienen una o varias de las mutaciones descritas en la presente memoria se ensayan para aplicaciones de limpieza con agua fría con los métodos y las composiciones detergentes descritos en la presente memoria.

Ejemplo 38

Construcción de bibliotecas y variantes adicionales de GG36

Este ejemplo describe la limpieza con agua fría de las variantes combinatorias de GC36 que contienen una o más de las siguientes mutaciones: A016S, T022A, S024R, N062E, N076D, E089P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, S166D, R186H, S188D, Y209E, Q236H, N238R, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, E271F (numeración de BPN'). Las variantes combinatorias se construyeron por ADN 2,0, Inc, usando un plásmido de expresión de *B. subtilis* (p. ej., pHPLT-GG36; Fig. 2) y la cepa de *B. subtilis* (genotipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). En el caso de las bibliotecas de ADN, se proporcionó una reacción de ligación de cada una de las bibliotecas construidas usando un plásmido de expresión de *B. subtilis* (p. ej., pHPLT-GG36; Fig. 2) mediante el ADN 2,0, Inc. para la transformación en la cepa de *B. subtilis* (genotipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Las variantes generadas que contenían una o más de estas mutaciones enumeradas anteriormente se ensayaron para la limpieza con agua fría en el ensayo de micromuestras de SLT (MÉTODO DE ENSAYO 6) usando los métodos y las composiciones detergentes descritas en esta solicitud.

TABLA 11-1. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes de biblioteca de NHJ6.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,1 = + en el detergente b, d o e**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo SLT; Detergente del Ejemplo 36b, 36d o 36e, 16 C
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D	+++

TABLA 11-L. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes de biblioteca de NHJ6.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,1 = + en el detergente b, d o e**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo SLT; Detergente del Ejemplo 36b, 36d o 36e, 16 C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++

T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D	++

H249R	
T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D	+

TABLA 11-2. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes de biblioteca de NHJ6.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,1 = +**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo SLT, detergente del Ejemplo 36 g, 16 C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	+

H249R	

TABLA 11-3. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes combinatorias de NHJ7.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,1 = + en el detergente del Ejemplo 36b, 36d o 36e**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo BMI, detergente del Ejemplo 36b, 36d o 36e, 16 C

TABLA 11-3. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes combinatorias de NHJ7.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,1 = + en el detergente del Ejemplo 36b, 36d o 36e**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo BMI, detergente del Ejemplo 36b, 36d o 36e, 16 C
T022A-S128N-A158E-H249R	+++
T022A-N062E-A158E	+++
T022A-S101A-A158E-R186H-H249R	++
A016S-T022A-A158E-R186H-E271F	+
T022A-S128N-A158E-R186H	+
T022A-S128N-R186H-S188D-	+
N062E-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R	+
T022A-A158E-R186H-H249R-E271F	+
T022A-V104L-A158E-H249R	+
T022A-V104L-R186H-S188D-H249R	+

Ejemplo 39

5

Construcción de bibliotecas y variantes adicionales de GG36

Este Ejemplo describe la construcción de variantes y bibliotecas de GG36 en *B. subtilis*, usando una o más de las siguientes mutaciones (numeración de BPN'): A001R, Q002S, Q002M, Q002A, Q002R, Q002W, S003R, V004R, V004S, V004C, I008A, S009A, S009F, S009W, R010S, R010A, R010H, R010M, Q012F, Q012R, P014K, P014F, P014Q, A015R, A015F, A016S, H017R, H017M, H017F, N018R, N018K, G020F, G020K, G020R, T022A, T022Y, T022V, T022Q, T022L, T022W, G023A, G023S, G023F, S024R, S024F, S024W, S024Q, S024H, S024L, G025V, G025F, G025R, V026F, K027L, K027F, K027R, K027V, V028A, V028N, V028E, A029T, V030E, L031F, T033S, T033G, T033D, G034P, I035M, S036T, S036F, S036R, T038L, T038F, T038R, P040N, P040L, P040T, P040W, P040H, P040R, L042I, N043A, N043F, N043I, N043S, N043R, N043M, N043W, N043D, R045T, G046R, A048R, F050C, V051W, V051F, V051H, P052F, P052E, P052N, P055Y, T057R, Q059A, Q059F, Q059R, D060P, D060Q, D060A, N062E, N062Q, G063V, G063M, G063T, G063I, G063A, G063S, G063H, G063Q, G063D, G063E, G063P, H064F, H064T, V068A, V068C, A069N, A069T, A069P, A069W, T071G, I072C, A074C, L075A, L075F, L075E, N075R, N076D, S078R, S078N, S078I, I079W, I079Q, V081R, L082F, L082T, L082V, L082R, L082M, A085M, P086W, P086L, P086I, E089P, E089T, E089G, E089H, E089L, E089V, E089W, E089F, E089I, Y091N, Y091F, A092F, K094N, S099F, S099T, S099P, S099G, S099M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A, Q182R, N183I, N183D, N183M, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239H, P239T, P239N, P239F, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, y T274G. Las variantes y las bibliotecas se construyeron por DNA2.0, Inc., como se describe en el Ejemplo 41. Las variantes generadas que contenían una o más de estas mutaciones se ensayaron para la limpieza con agua fría en el ensayo de micromuestras de tela de SLT usando los métodos y las composiciones detergentes descritas en esta aplicación en el Método de ensayo 6.

TABLA 12-6. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes de biblioteca de NHJ8, NHJ9, NHJ14.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,5 es +++; IR entre 1,49 y 1,3 = ++; IR entre 1,29 y 1,1 = + en el detergente del Ejemplo 36c**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo SLT, detergente del Ejemplo 36c, 16 C
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245RN248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248DE271F	++
T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245RN248D-E271F	++
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++

TABLA 12-7. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes de biblioteca de NHJ9.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,1 = + para el detergente del Ejemplo 36f**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo SLT; Detergente del ejemplo 36f 16 C
H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245RN248D-E271F	+++
T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249RE271F	++
H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248DE271F	++
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249RE271F	+
T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248DE271F	+

TABLA 12-10. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes de biblioteca de NHJ15.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,1 = + en el detergente del Ejemplo 36a**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo SLT, detergente del Ejemplo 36a, 16 C
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248DE271F	+++
T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D	+++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232VQ245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245RN248D	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232VN248D	++
T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232VN248D-E271F	++
T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245RN248D	++

TABLA 12-10. Capacidad limpiadora BMI de las variantes de biblioteca NHJ15.**IR = índice de rendimiento****IR > 0 = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,1 = + en el detergente del Ejemplo 36a**

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo BMI, detergente del Ejemplo 36a, 16 C
T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D	++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++

T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+
T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D	+

TABLA 12-12. Capacidad limpiadora de SLT de las variantes de biblioteca de NHJ15 y NHJ16.

IR = índice de rendimiento

IR > 0 = 1,3 es +++; IR entre 1,29 y 1,2 = ++; IR entre 1,19 y 1,1 = + en el detergente del Ejemplo 36a, 36d o 36f

Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; SLT, detergente del Ejemplo 36a, 36d o 36f; 16 C
T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188DA232V-Q245R-N248D	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D	+++
T022A-5024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232VN248D	+

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Procter & Gamble

<120> PRODUCTOS DE CONSUMO CON VARIANTES DE PROTEASA

<130> 11710M&D

<160> 77

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
115 120 125

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

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

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

ES 2 745 011 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 275
<212> PRT
<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 2

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1 5 10 15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
35 40 45

Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
50 55 60

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

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

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
100 105 110

Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125

ES 2 745 011 T3

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
130 135 140

Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
145 150 155 160

Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
165 170 175

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
195 200 205

Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225 230 235 240

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
245 250 255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
260 265 270

Ala Ala Gln
275

<210> 3
<211> 380
<212> PRT
<213> Bacillus lentus

<400> 3

Val Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys
20 25 30

Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe
35 40 45

Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu
50 55 60

ES 2 745 011 T3

Glu	Glu	Val	Glu	Ile	Glu	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Glu	Thr	Ile	Pro	Val	65	70	75	80
Leu	Ser	Val	Glu	Leu	Ser	Pro	Glu	Asp	Val	Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Asp	85	90	95	
Pro	Ala	Ile	Ser	Tyr	Ile	Glu	Glu	Asp	Ala	Glu	Val	Thr	Thr	Met	Ala	100	105	110	
Gln	Ser	Val	Pro	Trp	Gly	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Pro	Ala	Ala	His	115	120	125	
Asn	Arg	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Val	Lys	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	130	135	140	
Gly	Ile	Ser	Thr	His	Pro	Asp	Leu	Asn	Ile	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	145	150	155	160
Val	Pro	Gly	Glu	Pro	Ser	Thr	Gln	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	165	170	175	
Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	180	185	190	
Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	195	200	205	
Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ala	Gly	210	215	220	
Asn	Asn	Gly	Met	His	Val	Ala	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser	Pro	225	230	235	240
Ser	Ala	Thr	Leu	Glu	Gln	Ala	Val	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly	Val	245	250	255	
Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ser	Tyr	260	265	270	
Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln	Asn	275	280	285	
Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile	Val	290	295	300	
Ala	Pro	Gly	Val	Asn	Val	Gln	Ser	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ala	305	310	315	320

ES 2 745 011 T3

Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala
325 330 335

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

Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr
355 360 365

Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
370 375 380

<210> 4
<211> 1143
<212> ADN
<213> Bacillus lentus

<400> 4
gtgagaagca aaaaattgtg gatcgtcgcg tcgaccgcac tactcatttc tgttgctttc 60
agttcatcga tcgcatcggc tgctgaagaa gcaaaagaaa aatatttaaat tggctttaat 120
gagcaggaag ctgtcagtga gttttagtaa caagtagagg caaatgacga ggtcgccatt 180
ctctctgagg aagaggaagt cgaaattgaa ttgcttcatg aatttgaaac gattcctggt 240
ttatccggtt agttaagccc agaagatgtg gacgcgcttg agctcgatcc agcgatttct 300
tatattgaag aggatgcaga agtaacgaca atggcgcaat cagtgccatg gggaattagc 360
cgtgtgcaag cccagctgc ccataaccgt ggattgacag gttctggtgt aaaagttgct 420
gtcctcgata caggatattc cactcatcca gacttaaata ttcgtggtgg cgctagcttt 480
gtaccagggg aaccatccac tcaagatggg aatgggcatg gcacgcatgt ggccgggacg 540
attgctgctt taaacaattc gattggcggt cttggcgtag cgccgagcgc ggaactatac 600
gctgttaaag tattaggggc gagcgggtca ggttcggta gctcgattgc ccaaggattg 660
gaatgggcag ggaacaatgg catgcacgtt gctaatttga gtttaggaag cccttcgcca 720
agtgccacac ttgagcaagc tgtaaatagc gcgacttcta gaggcggttct tgttgtagcg 780
gcatctggaa attcaggtgc aggctcaatc agctatccgg cccgttatgc gaacgcaatg 840
gcagtcggag ctactgacca aaacaacaac cgcgccagct ttacacagta tggcgcaggg 900
cttgacattg tcgcaccagg tgtaaacgtg cagagcacat acccagggtc aacgtatgcc 960
agcttaaacy gtacatcgat ggctactcct catgttgtag gtgcagcagc ccttggttaa 1020
caaaagaacc catcttggtc caatgtacaa atccgcaatc atctaaagaa tacggcaacg 1080
agcttaggaa gcacgaactt gtatggaagc ggacttgta atgcagaagc tgcaactcgt 1140
taa 1143

<210> 5
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 5
 aaagtattag gggcgagcgg tgcaggtgga cttagctcga ttgcccaagg attg 54

 <210> 6
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 6
 catctggaaa ttcaggtgca gaatcaatca gctatccggc ccgtta 46

 <210> 7
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 7
 ctgcccataa ccgtggattg gcaggttctg gtgtaaaagt tgctg 45

 <210> 8
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 8
 ctgcccataa ccgtggattg gcaggttctg gtgtaaaagt tgctg 45

 <210> 9
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 9
 gaagcggact tgtcaatgca ttogctgcaa ctogttaaag cttg 44

 <210> 10
 <211> 48

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 10
 aaagtattag gggcgagcgg tgcaggttcg gtcagctcga ttgcccaa 48

 <210> 11
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 11
 tattaggggc gagcgggttca ggtggagtca gctcgattgc ccaagga 47

 <210> 12
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 12
 gtcagctcga ttgcccaagg agtagaatgg gcagggaaca atggca 46

 <210> 13
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 13
 cgttgcta at ttgagtttag gaaacccttc gcccaagtgc acacttga 48

 <210> 14
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 14
 gaaccatcca ctcaagatgg ggaagggcat ggcacgcatg tg 42

 <210> 15
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

 <400> 15
 accaaaacaa caaccgcgcc gacttttcac agtatggcgc agggctt 47

 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 16
 catatgagtt atgcagtttg tag 23

 <210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 17
 tgtttttctt ggaattgtgc tgt 23

 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 18
 cagttttag aatgcaaaaa gtg 23

 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 19
 gacaaggtaa aggataaaac agc 23

 <210> 20
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

<400> 20
cataaccgtg gattggcagg ttctggtgta aaagttgctg 40

<210> 21
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 21
actttttacac cagaacctgc caatccacgg ttatgggcag 40

<210> 22
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 22
cactcaagat ggggaagggc atggcacgca tgtgg 35

<210> 23
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 23
atgcgtgccca tgcccttccc catcttgagt ggatggttc 39

<210> 24
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 24
gcgagcgggtt caggtggagt cagctcgatt gcccaagga 39

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

<220>
<223> Iniciador

<400> 25
tgggcaatcg agctgactcc acctgaaccg ctcgcccta 40

<210> 26
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 26
 gtggagtcag ctcgattgcc caaggagtag aatgggcagg gaacaatggc at 52

<210> 27
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 27
 cattctactc cttgggcaat cgagctgact ccacctgaac cgctcgcccc ta 52

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

<220>
 <223> Iniciador

<400> 28
 gcgagcggtg gaggtgcat cagctcgatt gcccaaggat tg 42

<210> 29
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 29
 cttgggcaat cgagctgatc gcacctccac cgctcgcccc taatacttta 50

<210> 30
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 30
 gcgagcggtg caggtggact tagctcgatt gcccaaggat tg 42

<210> 31
 <211> 50

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 31
 cttgggcaat cgagctaagt ccacctgcac cgctcgcccc taatacttta 50

 <210> 32
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 32
 tattagggggc gagcgggtgca gggttcgggtca gctcgattgc 40

 <210> 33
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 33
 atcgagctga ccgaacctgc accgctcgcc cctaatactt ta 42

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

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 34
 ctaatttgag tttaggaaac ccttcgccaa gtgccacact t 41

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

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 35
 gcacttggcg aagggtttcc taaactcaaa ttagcaacgt g 41

 <210> 36
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

```

<220>
<223>  Iniciador

<400>  36
gaaattcagg tgcagactca atcagctatc cggcccgtt      39

<210>  37
<211>  38
<212>  ADN
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Iniciador

<400>  37
ggatagctga ttgagtctgc acctgaattt ccagatgc      38

<210>  38
<211>  39
<212>  ADN
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Iniciador

<400>  38
gaaattcagg tgcagaatca atcagctatc cggcccgtt      39

<210>  39
<211>  38
<212>  ADN
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Iniciador

<400>  39
ggatagctga ttgattctgc acctgaattt ccagatgc      38

<210>  40
<211>  41
<212>  ADN
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Iniciador

<400>  40
aacgtgcaga gcacagaacc aggttcaacg tatgccagct t      41

<210>  41
<211>  40
<212>  ADN
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Iniciador

```

<400> 41	
catacgttga acctggttct gtgctctgca cgtttacacc	40
<210> 42	
<211> 41	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Iniciador	
<400> 42	
tcgattgccc aaggagtaga atgggcaggg aacaatggca t	41
<210> 43	
<211> 43	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Iniciador	
<400> 43	
cattgttccc tgcccattct actccttggg caatcgagct gac	43
<210> 44	
<211> 810	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<400> 44	
gcgcaatcag tgccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgccc taaccgtgga	60
ttgacagggtt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac	120
ttaaataattc gtggtggcgc tagctttgta ccagggggaac catccactca agatgggaat	180
gggcatggca cgcattgtggc cgggacgatt gctgctctaa acaattcgat tggcgtactt	240
ggcgtagcgc cgagcgcgga actatacgct gttaaagtat taggggagcg cgggtgggggc	300
gccatcagct cgattgcccc aggattggaa tgggcaggga acaatggcat gcacgttgct	360
aatttgagtt taggaagccc ttcgccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg	420
acttctaggg gcgttcttgt tgtagcggca tctggaaatt cgggtgcaga ctcaatcagc	480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc	540
gccagctttt cacagtatgg cgcagggtt gacatcgctg caccaggtgt aaacgtgcag	600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccggta catcgatggc tactcctcat	660
gttgacagggtg cagcagtcct tggttaaacat aagaacccat cttggtccaa tgtacgaatc	720
cgcgatcatc taaagaaaac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaagcgga	780
cttgtcaatg ccgaagctgc aactcgttaa	810

ES 2 745 011 T3

<210> 45
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Bacillus lentus

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

ES 2 745 011 T3

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

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

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

<210> 46
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 46
gtattagggg cgagcgggtgg cggcgccatc agctcgattg c 41

<210> 47
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 47
gcaatcgagc tgatggcgcc gccaccgctc gcccctaata c 41

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

<220>
<223> Iniciador

<400> 48
ggggcgagcg gtgggggagg catcagctcg attgcccaag 40

<210> 49
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 49
cttgggcaat cgagctgatg ccgccccac cgctcgcccc 40

<210> 50
<211> 44
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 50
gggcgagcgg tgggggcgcc gttagctcga ttgcccaagg attg 44

<210> 51
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 51
caatccttgg gcaatcgagc taacggcgcc cccaccgctc gccc 44

<210> 52
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 52
gcatctggaa attcgggtgc aggctcaatc agctatccgg cccgt 45

<210> 53
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 53
acgggcccga tagctgattg agcctgcacc cgaatttcca gatgc 45

<210> 54
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 54
ctcatgttgc aggtgcagca gcacttgta aacataagaa ccc 43

<210> 55
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 55
gggttcttat gtttaacaag tgctgctgca cctgcaacat gag 43

<210> 56
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 56
gtgcagcagt ccttggttaa caaaagaacc catcttggtc caat 44

<210> 57
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 57
attggaccaa gatgggttct tttgtttaac aaggactgct gcac 44

<210> 58
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 58
ccatcttggc ccaatgtaca aatccgcgat catctaaaga aaac 44

<210> 59
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 59
gttttcttta gatgatcgcg gatttgtaca ttggaccaag atgg 44

<210> 60
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 60

ggtccaatgt acgaatccgc aatcatctaa agaaaacggc aac 43

<210> 61
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 61
 gttgccgttt tcttttagatg attgcggtt cgtacattgg acc 43

<210> 62
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 62
 gaatccgcga tcatctaaag aatacggcaa cgagcttagg aag 43

<210> 63
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 63
 cttcctaagc tcgttgccgt attctttaga tgatcgcgga ttc 43

<210> 64
 <211> 807
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<400> 64
 gcgcaatcag tgccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cggctgcca taaccgtgga 60
 ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
 ttaaataattc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac catccactca agatgggaat 180
 gggcatggca cgcattgtggc cgggacgatt gctgctctaa acaattcgat tggcgtactt 240
 ggcgtagcgc cgagcgcgga actatacgct gttaaagtat taggggagag cgggtggggc 300
 gccatcagct cgattgcccaggattggaa tgggcaggga acaatggcat gcacgttgct 360
 aatttgagtt taggaagccc ttgcgaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg 420
 acttctaggg gcgttcttgt tgtagcggca tctggaaatt cgggtgcaga ctcaatcagc 480
 tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc 540

ES 2 745 011 T3

```

gccagctttt cacagtatgg cgcagggcctt gacatcgctcg caccaggtgt aaacgtgcag      600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaacggta catcgatggc tactcctcat      660
gttgcaggtg cagcagtcct tgtaaaciaa aagaacccat cttgggtcaa tgtacgaatc      720
cgcgatcatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaagcgga      780
cttgtcaatg ccgaagctgc aactcgt      807

```

```

<210> 65
<211> 269
<212> PRT
<213> Bacillus lentus

```

```

<400> 65

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
115         120         125

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile

```

ES 2 745 011 T3

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

<210> 66
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 66
 gtacgaatcc gcgatagact aaagaatacg gcaacgag

38

<210> 67
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 67
 gcggacttgt caatgccttt gctgcaactc gttaaagctt acat

44

<210> 68
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 68
 ggaaattcgg gtgcagaatc aatcagctat ccgccccgtt a

41

<210> 69
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 69
 ctggaaattc ggggtgaagac tcaatcagct atccggcc 38

<210> 70
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 70
 cggcatctgg aaattcgggt gaaggctcaa tcagctatcc ggcccgttat g 51

<210> 71
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 71
 cataaccgtg gattggcagg ttctggtgta aaagttgctg tc 42

<210> 72
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 72
 tccactcaag atggggaagg gcatggcacg catgtggc 38

<210> 73
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 73
 cttgttaaac aaaagagacc atcttgggtcc aatgtacgaa tc 42

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

<220>
 <223> Iniciador

<400> 74	
aatgtacgaa tccgcagaca tctaaagaat acggcaacga gc	42
<210> 75	
<211> 43	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Iniciador	
<400> 75	
cgatcatcta aagaatagag caacgagctt aggaagcacg aac	43
<210> 76	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Iniciador	
<400> 76	
gtggattgac aggtagaggt gtaaaagttg ctgtcctcga ta	42
<210> 77	
<211> 43	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Iniciador	
<400> 77	
acgattgctg ctctagataa ttcgattggc gtacttggcg tag	43

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un material adyuvante y una variante de proteasa de agua fría; siendo dicha composición un producto de consumo, y siendo dicha variante de proteasa una variante de una proteasa precursora; siendo dicha secuencia de proteasa precursora, al menos, un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos id. de sec. n.º 1, teniendo dicha variante una o más de las siguientes características:

a) un índice de rendimiento del Método de ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2; de 1,1 a 10, de 1,1 a 8 o incluso de 1,1 a 5;

b) un índice de rendimiento del Método de ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2; de 1,1 a 10, de 1,1 a 8 o incluso de 1,1 a 5;

c) un índice de rendimiento del Método de ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,0 a 10, de 1,0 a 8 o incluso de 1,0 a 5;

d) un índice de rendimiento del Método de ensayo 6 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2; de 1,1 a 10, de 1,1 a 8 o incluso de 1,1 a 5,

en donde el Método de ensayo 2, el Método de ensayo 3, el Método de ensayo 4 y el Método de ensayo 6 se describen explícitamente en los "MÉTODOS DE ENSAYO" de la presente memoria, siendo dicha variante de proteasa mutada de tal manera que las mutaciones consisten de uno de los siguientes conjuntos de mutaciones, en donde cada posición de aminoácido está numerada según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la id. de sec. n.º 2:

T022A-N062E, T022A-P129E, T022A-L111V, T022A-S188D, A016S-T022A,
T022A-E089P, T022A-G159E, T022A-A158E,
T22A-L111V-G159E,
T22A-S103G-G159E
T22A-S128N-E271F-Y209E
T22A-Y209E-E271F
T22A-S101A-Y209E
T22A-L111V-S128N
T22A-S101A-G159E
T22A-S101A-S103G-V104L
T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D

T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248Daaa
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101 G-S 103 A-VI 04I-L148I-AI 58E-A232V-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R
T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D
T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S128N-A158E-H249R
T022A-N062E-A158E
T022A-S101A-A158E-R186H-H249R
A016S-T022A-A158E-R186H-E271F
T022A-S128N-A158E-R186H
T022A-S128N-R186H-S188D-
T022A-A158E-R186H-H249R-E271F
T022A-V104L-A158E-H249R
T022A-V104L-R186H-S188D-H249R
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F
H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F
T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F
T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D

T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R- N248D
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D
T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D- E271F
T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F
T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F
T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F
T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D
T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D- E271F
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D
T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D

2. Una composición según la reivindicación 1, en donde la proteasa de agua fría tiene un índice de rendimiento del Método de ensayo 6 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2; de 1,1 a 10, de 1,1 a 8 o incluso de 1,1 a aproximadamente 5.
3. Una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho material adyuvante comprende uno o más seleccionados de:
 - a. un encapsulado que comprende un perfume, comprendiendo preferiblemente dicho encapsulado, una microcápsula de perfume;
 - b. un agente de matizado que comprende preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en tintes básicos, ácidos, hidrófobos, directos y poliméricos y tintes conjugados que tienen una longitud de onda de absorción máxima de 550 nm a 650 nm y mezclas de los mismos;
 - c. tensioactivo detergente que comprende preferiblemente un material seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos detergentes aniónicos, tensioactivos detergentes no iónicos, tensioactivos detergentes catiónicos, tensioactivos detergentes de ion híbrido y tensioactivos detergentes anfóteros y mezclas de los mismos;
 - d. aditivo reforzante de la detergencia que comprende preferiblemente un material seleccionado del grupo que consiste en zeolitas, fosfatos y mezclas de los mismos;
 - e. una sal de silicato que comprende preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en silicato de sodio, silicato de potasio y mezclas de los mismos;
 - f. abrillantador que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en abrillantadores solubles en agua fría y mezclas de los mismos;
 - g. un polímero de carboxilato que comprende preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en copolímero aleatorio de maleato/acrilato u homopolímero de poliácido y mezclas de los mismos;
 - h. un polímero de desprendimiento de la suciedad que comprende preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de tereftalato y mezclas de los mismos;

- i. un polímero celulósico que comprende preferiblemente un material seleccionado del grupo que consiste en alquilcelulosa, alquilalcoxilalquilcelulosa, carboxialquilcelulosa, alquilcarboxialquilcelulosa y mezclas de los mismos;
- 5 j. un catalizador del blanqueador que comprende preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en cationes iminio, poliiones iminio; iones híbridos de iminio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas cíclicas de azúcar y catalizadores de metales de transición o ligandos para la formación de los mismos o mezclas de los mismos;
- 10 k. un activador del blanqueador que comprende preferiblemente un material seleccionado del grupo que consiste en dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoil oxibenzoico o sales del mismo, 3,5,5-trimetil hexanoiloxibenceno sulfonato, tetraacetililen-diamina (TAED), nonanoiloxibenceno sulfonato (NOBS) y mezclas de los mismos;
- 15 l. una fuente de peróxido de hidrógeno que comprende preferiblemente, un material seleccionado del grupo que consiste en sales perhidratadas inorgánicas, incluidas las sales de metales alcalinos tales como sales sódicas de perborato (usualmente mono o tetra-hidrato), sales de percarbonato, de persulfato, de perfosfato, de persilicato y mezclas de las mismas;
- 20 m. un quelante que comprende preferiblemente un material seleccionado del grupo que consiste en DTPA (ácido dietilen-triamino-pentaacético), HEDP (ácido hidroxietano difosfónico), DTPMP (ácido dietilentriamino penta (metilénfosfónico)), ácido etilendiamino disuccínico (EDDS), sal hidratada disódica del ácido 1,2-dihidroxibenceno-3,5-disulfónico, derivados de dichos quelantes;
- 25 n. una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en: (a) lipasas de primer lavado; (b) celulasas bacterianas de limpieza; (c) alfa-amilasas; y (d) mezclas de las mismas; y
- o. mezclas de los mismos.
4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, proporcionada en forma de una dosis unitaria única o multicompartimental, preferiblemente, una dosis unitaria multicompartimental, en donde la variante de proteasa está preferiblemente en un compartimento diferente a cualquier fuente de peróxido de hidrógeno y/o quelante.
- 30 5. Un método para tratar y/o limpiar una superficie, preferiblemente, una superficie de tejido que comprende las etapas de (i) poner en contacto dicha superficie con una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en una solución de lavado acuosa; y (ii) enjuagar y/o secar la superficie.
- 35 6. Un método según la reivindicación 5, en donde la solución de lavado acuosa comprende de 0,1 g/l a 3 g/l de tensioactivo.

FIGURA 1 – alineamiento de las proteasas maduras de referencia de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (Id. de sec. n.º:2) y proteasa GG36 de subtilisina de *B. lentus* (Id. de sec n.º:1).

```

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

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

BPN'   121 VINMSLGGPS GSAALKAADV KAVASGVVVV AAAGNEGTSQ SSSTVGYPGK YPSVIAVGAV
GG36   119 VANLSLGSFS PSATLEQAVN SATSRGVLVV AASGNSGAGS ----ISYPAR YANAMAVGAT

BPN'   181 DSSNQRFASF QYGPELDVMV PGVSIQSTLP GNKYGAYNGT SMASPHVAGA AALILSKHPN
GG36   175 DQNNNRASFQ QYGAGLDIVA PGVNVQSTYP GSTYASLNGT SMATPHVAGA AALVKQKNPS

BPN'   241 WINTQVRSSL ENTITKLGDS FYYGKGLINV QAAAQ
GG36   235 WSNVQIRNHL KNTATSLGST NLYGSGLVNA EAATR

```

FIGURA 2 - plásmido de expresión pHPLT-GG36

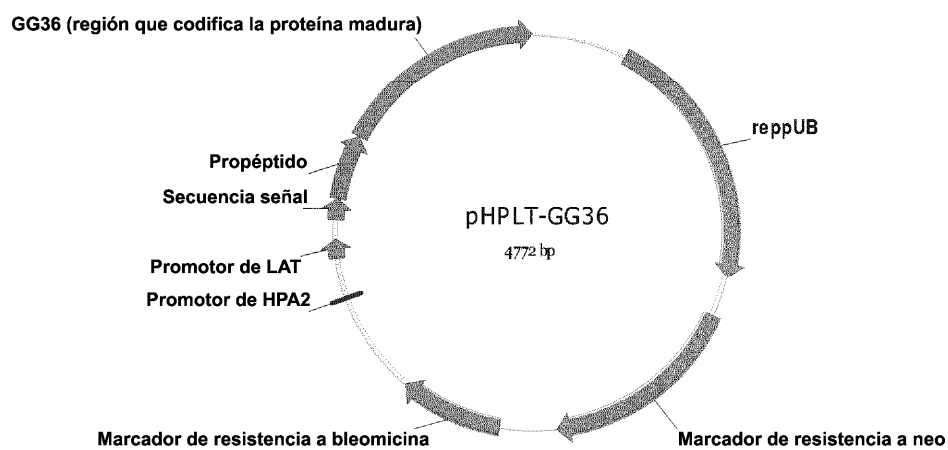


FIGURA 3 – plásmido de expresión pRA68.

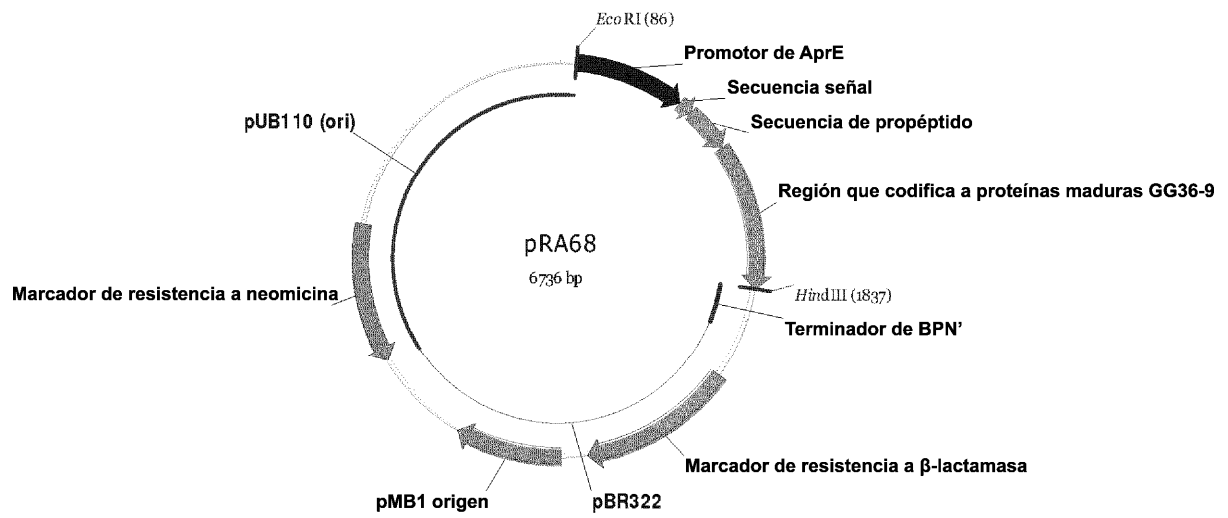


FIGURA 4 – plásmido de expresión pRA96

