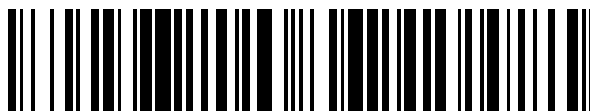


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 663**

51 Int. Cl.:

C12N 9/28 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2005 E 05788794 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1794292**

54 Título: **Variantes de α -amilasa estabilizadas frente a di- y/o multimerización, procedimiento para su producción así como agentes de lavado y de limpieza con estas variantes de α -amilasa**

30 Prioridad:

01.10.2004 DE 102004047776

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

07.03.2016

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**BESSLER, CORNELIUS;
WIELAND, SUSANNE y
MAURER, KARL-HEINZ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 562 663 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de α -amilasa estabilizadas frente a di- y/o multimerización procedimiento para su producción así como agentes de lavado y de limpieza con estas variantes de α -amilasa

5 La presente invención se refiere a variantes de α -amilasa que están estabilizadas mediante mutagénesis puntual de aminoácidos de superficie frente a una di- y/o multimerización mediada por interacciones electrostáticas, a procedimientos para su producción a través de mutagénesis de restos de aminoácido con una contribución al potencial electrostático de la molécula así como a agentes de lavado y de limpieza con estas variantes de α -amilasa.

10 Las α -amilasas (E.C. 3.2.1.1) hidrolizan enlaces α -1,4-glicosídicos internos de almidón y polímeros similares al almidón con la formación de dextrinas y oligosacáridos β -1,6-ramificados. Pertenecen en general a las enzimas más importantes técnicamente. Así, las α -amilasas se usan por ejemplo en la producción de jarabe de glucosa, para el tratamiento de materias primas en la fabricación de material textil, para la producción de adhesivos o para la producción de constituyentes de alimentos o alimentos que contienen azúcar. Otro campo de uso importante es aquél como componente activo en agentes de lavado y de limpieza.

15 Debido a que los agentes de lavado y de limpieza presentan principalmente valores de pH alcalinos, se usan para ello en particular α -amilasas que son activas en medio alcalino. Éstas se producen y se secretan por microorganismos, es decir, hongos o bacterias, sobre todos aquéllos de los géneros *Aspergillus* y *Bacillus*. A partir de estas enzimas naturales se proporciona entremedias una cantidad casi inmensa de variantes, que se han derivado a través de mutagénesis y presentan ventajas específicas en función del campo de uso.

20 Ejemplos de ello son las α -amilasas de *Bacillus licheniformis*, de *B. amiloliquefaciens* y de *B. stearothermophilus* así como sus perfeccionamientos mejorados para el uso en agentes de lavado y de limpieza. La enzima de *B. licheniformis* puede obtenerse de la empresa Novozymes con el nombre Termamyl[®] y de la empresa Genencor con el nombre Purastar[®]ST. Productos de desarrollo de esta α -amilasa pueden obtenerse de la empresa Novozymes con los nombres comerciales Duramyl[®] y Termamyl[®]ultra, de la empresa Genencor con el nombre Purastar[®]OxAm y de la empresa Daiwa Seiko Inc., Tokio, Japón, como Keistase[®]. La α -amilasa de *B. amiloliquefaciens* se comercializa de la empresa Novozymes con el nombre BAN[®], y variantes derivadas de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* con los nombres BSG[®] y Novamyl[®], así mismo de la empresa Novozymes.

25 Ejemplos de α -amilasas de otros organismos son los perfeccionamientos que pueden obtenerse con los nombres comerciales Fungamyl[®] de la empresa Novozymes de la α -amilasa de *Aspergillus niger* y *A. oryzae*. Un producto comercial adicional es por ejemplo la Amylase-LT[®].

30 Así mismo se remite a la α -amilasa de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) divulgada en la solicitud WO 02/10356 A2 y la ciclodextrina-glucanotransferasa (CGTasa) de *B. agaradherens* (DSM 9948) que se describe en la solicitud WO 02/44350 A2. Adicionalmente, por ejemplo en las solicitudes WO 03/002711 A2 y WO 03/054177 A2 se definen espacios de secuencia de α -amilasas, que podrían ser adecuadas en principio para las aplicaciones correspondientes.

35 Mutaciones puntuales para la mejora de la actividad de estas enzimas en el medio alcalino se describen por ejemplo en la solicitud no publicada previamente DE 10309803.8. Según esta solicitud, son adecuadas para ello sustituciones de aminoácido en las posiciones 13, 32, 194, 197, 203, 230, 297, 356, 406, 414 y/o 474 según la enumeración de la α -amilasa de *B. amiloliquefaciens* no procesada. Éstas son en la numeración de la α -amilasa no procesada de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368; documento WO 02/10356 A2) las posiciones L13, T36, W198, S201, 40 1208, A235, D302, D361, H408, K416 o N476, con las siguientes sustituciones especialmente eficaces: 13P, 32A, 194R, 197P, 203L, 230V, 297D, 356D, 406R, 414S y 474Q.

45 Un ejemplo adicional para la mutagénesis puntual en α -amilasas es la solicitud WO 00/22103 A1. En ella se divulgan polipéptidos entre los que se divulgan también variantes de α -amilasa con aminoácidos de superficie mutagenizados. El objetivo de esta mutagénesis ha consistido en reducir la inmunogenicidad y/o alergenicidad procedente de estas moléculas.

50 Así mismo, se describen productos de fusión de α -amilasas para su uso en agentes de lavado y de limpieza. De este modo, por ejemplo en la solicitud WO 96/23874 A1 se divulgan híbridos de las α -amilasas de *Bacillus licheniformis*, *B. amiloliquefaciens* y *B. stearothermophilus*. Las amilasas híbridas de este tipo pueden producirse de acuerdo con la enseñanza de esta solicitud para la determinación de la estructura tridimensional de estas amilasas, para reconocer a través de ella posiciones importantes para la actividad enzimática. Las solicitudes WO 97/41213 A1 y WO 00/60059 A2 describen perfeccionamientos a este respecto, de las que se desprenden numerosas variantes de α -amilasa que están mejoradas en cada caso con respecto a su rendimiento. Amilasas híbridas especiales de *B. licheniformis* y *B. amiloliquefaciens* se divulgan en la solicitud WO 03/014358 A2.

55 Otro estado de la técnica importante lo forman las tres solicitudes de patente WO96/23873 A1, WO00/60060 A2 y WO01/66712 A2, que representan la base para el producto comercial Stainzyme[®] de la empresa Novozymes. Todas las variantes expuestas en las mismas en cada caso, que pueden obtenerse mediante mutagénesis puntual, tienen

propiedades enzimáticas modificadas y se reivindican o se describen por lo tanto para su uso en agentes de lavado y de limpieza. El documento WO 96/23873 A1 menciona en parte en cada caso varias mutaciones puntuales en más de 30 posiciones distintas en cuatro amilasas de tipo salvaje distintas. Éstas presentarán propiedades enzimáticas modificadas con respecto a la termoestabilidad, la estabilidad frente a la oxidación y la dependencia del calcio. Entre ellas se encuentran mutaciones puntuales en las siguientes posiciones, que están indicadas en cada caso con referencia a la α -amilasa de *Bacillus* sp. NCIB 12512: sustitución de aminoácidos oxidables en las posiciones M9, M10, M105, M202, M208, M261, M309, M382, M430 o M440, preferentemente M91L; M10L; M105L; M202L, T, F, I, V; M208L; M261L; M309L; M382L; M430L y M440L; deleciones de F180, R181, G182, T183, G184 y/o K185; así como adicionalmente las sustituciones K269R; P260E; R124P; M105F, I, L, V; M208F, W, Y; L217I; V206I, L, F; Y243F; K108R; K179R; K239R; K242R; K269R; D163N; D188N; D192N; D199N; D205N; D207N; D209N; E190Q; E194Q o N106D.

La solicitud WO00/60060 A2 nombra así mismo una pluralidad de posibles sustituciones de aminoácido en 10 posiciones distintas, en concreto por medio de dos α -amilasas muy similares de dos microorganismos distintos de igual numeración (las α -amilasas AA349 y AA4560). Éstas son las siguientes variaciones de secuencia: R181*, G182*, D183*, G184*; N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V; 1206A, R, D, N, C, E, Q, G, H, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V; E212A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V; E216A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V; K269A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V; y/o R181A, N, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V. También este desarrollo tiene como trasfondo conseguir una mejora del rendimiento a través de mutaciones.

Por último, el documento WO 01/66712 A2, designa 31 posiciones de aminoácido distintas, en parte idénticas a las mencionadas anteriormente, que se han mutado en una de las dos α -amilasas mencionadas en la solicitud WO 00/60060 A2 y se mejorarán tanto aspectos de rendimiento como aspectos de estabilidad. Estas son mutaciones puntuales en las siguientes posiciones: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445, K446, Q449, R458, N471 y N484, a su vez definidas a través de la α -amilasa AA560, es decir, también según su numeración. Entre ellas son ventajosas especialmente las siguientes variantes: Delta G184; Delta (R181-G182); Delta (D183-G184); R28N, K; S94K; R118K; N125A, R, K; N174D; R181Q, E, K; G186R; W189R, K; N195F; M202L, T; Y298H, F; N299A; K302R, S303Q, N306G, D, R, K; R310A, K, Q, E, H, D, N; N314D; R320K; H324K; E345R, D, K, N; Y396F; R400T, K; W439R; R444K; N445K, Q; K446N; Q449E; R458K; N471E y N484Q.

Así mismo, en esta solicitud mencionada en último lugar se describen cristales polipeptídicos, en particular aquéllos de enzimas podrían mejorarse con respecto a su poder de resolución porque en las moléculas, que se encuentran en el cristal en cuestión junto a las moléculas verdaderamente de interés y que interaccionan con las mismas, podrían mutarse aquellos aminoácidos que se encuentran dentro de una distancia de 6,0 Å con respecto al péptido de interés. Esto era válido en particular para enzimas similares a Termamyl, que se encuentran en un cristal junto a otras o las mismas enzimas similares a Termamyl; en este caso especialmente para una distancia de menos de 3,5 Å. Esto afectaría a las posiciones 19, 20, 21, 22, 25, 28, 29, 53, 76, 84, 87, 90, 93, 94, 124, 125, 126, 128, 142, 144, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 193, 195, 196, 197, 209, 212, 226, 229, 256, 257, 258, 259, 280, 281, 298, 299, 300, 302, 303, 304, 305, 306, 310, 311, 314, 319, 320, 321, 322, 341, 345, 405, 406, 408, 444, 447, 448, 449, 463, 464, 465, 466 y 467; o las posiciones 22, 25, 28, 76, 94, 125, 128, 158, 160, 171, 173, 174, 184, 189, 209, 226, 229, 298, 299, 302, 306, 310, 314, 320, 345, 405, 447 y 466 para la menor distancia.

A todas estas solicitudes con respecto a la mutagénesis puntual es común que también se evalúa el punto de vista de la estabilidad bajo el aspecto de un buen rendimiento en el campo de uso correspondiente. Puesto que la estabilidad mantenida durante el almacenamiento y el uso de las α -amilasas por ejemplo en el marco de formulaciones de agentes de lavado, lleva a un rendimiento alto y que se mantiene lo más alto posible durante el uso correspondiente. No se describe un aumento de la estabilidad, en particular frente a una formación de agregados, sobre todo en el transcurso del procesamiento.

Numerosas solicitudes persiguen el aumento de la estabilidad, que describen estabilizadores de enzimas especiales. Estos ingredientes adicionales provocan que una proteína y/o enzima contenida en medios correspondientes se proteja especialmente durante el almacenamiento frente a daños tal como, por ejemplo, la inactivación, desnaturalización o descomposición. De este modo, los inhibidores de proteasas reversibles forman un grupo de estabilizadores. Otros, por ejemplo polioles, estabilizan frente a influencias físicas, tal como por ejemplo la congelación. Otros compuestos poliméricos tal como polímeros acrílicos y/o poliamidas, estabilizan la preparación enzimática, entre otros, frente a oscilaciones del valor de pH. Los agentes de reducción y antioxidantes aumentan la estabilidad de las enzimas frente a la descomposición oxidativa.

Los compuestos de este tipo se añaden a las enzimas tanto durante la aplicación como en el transcurso de su procesamiento, lo que es importante en particular cuando en una etapa parcial del procesamiento, por ejemplo una precipitación, se haya separado un estabilizador previamente contenido junto con las impurezas restantes.

El estado de la técnica para la mejora de la estabilidad de α -amilasas puede resumirse tal como sigue: a través de mutagénesis puntual se ha desarrollado una pluralidad de variantes de α -amilasa, habiendo consistido el objetivo de estos desarrollos principalmente en mejorar las mismas con respecto a su rendimiento. En esta categoría figuran

también aquellas variantes que están estabilizadas con respecto a agentes desnaturalizadores tal como agentes de blanqueo o tensioactivos, porque en su caso, respectivamente, se optimiza al rendimiento deseado de la enzima. Por lo demás, para aumentar la estabilidad o el mantenimiento de la conformación físico-química, se recurre principalmente a compuestos adicionales que se denominan en su totalidad como estabilizadores.

- 5 Un aspecto menos tenido en cuenta hasta el momento en el desarrollo de enzimas consiste en estabilizar las moléculas en sí de modo que ya durante su procesamiento presenten una estabilidad aumentada con respecto a la molécula de tipo silvestre. Un efecto ventajoso adicional de ello debería consistir en que esta estabilidad aumentada debería favorecer también al uso previsto posteriormente de la enzima en cuestión.

10 La necesidad de esto se muestra en particular en el caso de las α -amilasas. Al menos algunas de ellas tienden, sobre todo durante el proceso de producción y de procesamiento a formar multímeros, concretamente en forma de agregados amorfos que precipitan de manera irreversible. De esta manera se pierden las actividades respectivas ya durante el procesamiento. Por un proceso de procesamiento se entiende todas las etapas de la producción a gran escala, del aislamiento de la enzima en cuestión, en particular los medios de fermentación habituales para la obtención biotecnológica, a través de las siguientes etapas de lavado y de separación (por ejemplo mediante precipitación) y la concentración hasta el confeccionamiento, por ejemplo, la granulación. En este caso son críticas, en particular aquellas etapas parciales en las que la enzima se encuentra en disoluciones con concentraciones comparativamente altas, porque, en este caso, visto desde el punto de vista estadístico, se producen contactos más frecuentes entre las moléculas que en el caso de concentraciones más bajas. En cambio, la formación de agregados puede aparecer también durante el almacenamiento de agentes que contienen α -amilasa o durante la aplicación, por ejemplo, durante el uso como ingrediente activo en procesos de lavado o de limpieza.

15 Esta problemática puede llevar a que si bien pueden obtenerse y examinarse α -amilasas individuales a escala de laboratorio, sin embargo se oponen a una producción a gran escala con ayuda de procedimientos habituales en general. Se habla entonces también de que estas enzimas tienen una baja estabilidad de proceso, con lo que se consideran las posibilidades más diversas de procesamiento y de uso. Por ejemplo, la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) muestra una mayor tendencia a la multimerización que la α -amilasa nativa de *B. licheniformis*. Planteamientos para la eliminación de este tipo de inestabilidad, es decir, para la disminución de la tendencia a la multimerización, harían accesibles las enzimas de este tipo a una producción a gran escala y con ello a los múltiples campos de uso, en general solo en cantidades técnicamente relevantes.

20 Se planteó por lo tanto el objetivo de estabilizar α -amilasas, y en particular la de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) en sí de modo que presenten una estabilidad aumentada en comparación con la molécula de partida con respecto a una formación de agregados.

Bajo un aspecto parcial de este objetivo debería determinarse en primer lugar una causa posible, basada en la estructura de las enzimas en cuestión para su tendencia a la formación de agregados. A continuación era válido oponerse a la misma con cambios de estructura adecuados.

35 Estos cambios de estructura repercutirían por un lado de manera ventajosa sobre el procesamiento, es decir, la obtención a gran escala de estas enzimas. Por otro lado, serían ventajosas también para el uso de las α -amilasas, por ejemplo, en agentes de lavado y de limpieza, porque esto iría acompañado adicionalmente de una actividad constantemente elevada durante el uso.

40 Se considerarían soluciones especialmente ventajosas de este objetivo por lo tanto aquellas α -amilasas, que junto a la estabilidad mencionada frente a una formación de agregados, muestren propiedades positivas adicionales con respecto a su uso previsto, en particular con respecto a su uso en agentes de lavado y de limpieza.

Esto era válido sobre todo para la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368). No obstante, se prefieren aquellas soluciones que puedan aplicarse a otras α -amilasas.

45 Como fundamento para el fenómeno, observado en particular en las α -amilasas, en particular en determinadas α -amilasas, de la formación de agregados, en la ruta para la solución del objetivo mencionado se tuvo en consideración la presencia de zonas con diferente potencial electrostático sobre la superficie de estas moléculas en su estructura nativa, globular, correctamente plegada. De este modo, por ejemplo grandes zonas de la superficie de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) están cargadas negativamente, mientras que otras zonas en parte de gran superficie tienen un potencial electrostático positivo o neutro. De este modo, a través de interacciones electrostáticas entre las zonas cargadas o polarizadas de diferente manera de varias moléculas, puede producirse su yuxtaposición y con ello una dimerización hasta la formación de multímeros. Esta interacción puede anularse de nuevo mediante agentes de desnaturalización añadidos, presumiblemente solo perjudicando a la estructura globular, es decir, con el riesgo de la inactivación irreversible. Por otro lado, esta interacción en sí, en particular cuando las fuerzas de atracción mutuas son suficientemente fuertes para influir en la estructura de la molécula, también sin intervención desde el exterior, puede llevar a agregados inactivos de forma irreversible.

55 Para resolver el objetivo planteado se sigue un planteamiento de biología molecular. Por lo tanto, mediante esto se influye sobre las propiedades enzimáticas mediadas por la simple secuencia de aminoácidos. A este respecto se

estableció sorprendentemente que modificaciones, es decir, mutaciones puntuales, que adaptan entre sí el patrón de carga sobre la superficie de estas moléculas, contrarrestan una formación de agregados.

5 Qué restos de aminoácido se encuentran “sobre la superficie de estas moléculas”, puede definirse a través de la estructura 3D de la proteína enzimática globular, a través de la denominada superficie de Conolly o a través del valor de la denominada accesibilidad, es decir, la accesibilidad de disolvente (véase más adelante). La contribución positiva, negativa o neutra observada al potencial electrostático de la molécula resulta a través de las propiedades químicas de los respectivos restos de aminoácido bajo la influencia de los restos de aminoácido adyacentes en cada caso, en particular adyacentes situados bajo la superficie y puede calcularse tal como se expone más adelante. La agregación observada parece producirse en particular cuando varios restos directamente adyacentes sobre la superficie presentan la misma polaridad o carga.

10 Sin desear restringirse a esta teoría, puede suponerse que la formación de agregados de α -amilasa puede atribuirse al menos en un porcentaje significativo a una di- y/o multimerización a lo largo de zonas de superficie cargadas diferentes y/o polares de diferente manera de estas moléculas de proteína. De este modo, las moléculas tienden a, de manera similar a los imanes, alinearse entre sí en una orientación regular. Una interrupción de la planitud de las zonas cargadas o polarizadas positivamente a favor de la carga negativa previamente reinante, estabiliza las α -amilasas por lo tanto frente a una formación de agregados basada en la multimerización. Esto favorece tanto la obtención (por ejemplo en una etapa de precipitación) y el almacenamiento (por ejemplo en disolventes hidrófobos que fomentan una agregación a través de regiones polares) como el uso.

15 Esta suposición se fundamenta en que la α -amilasa de *B. licheniformis* con una tendencia comparativamente baja a la multimerización, presenta un potencial de carga ampliamente negativo sobre su superficie.

20 Un efecto ventajoso adicional además de evitar la di- y/o multimerización, consiste en que las enzimas, consideradas desde un punto de vista estadístico, se encuentran cada vez más en su conformación nativa y no se deforman a través de las interacciones electrostáticas mencionadas, mediante lo cual se abren superficies de ataque distintas a los agentes de desnaturalización. Este efecto aumenta en conjunto su estabilidad, por ejemplo frente a disolventes orgánicos y tensioactivos, que se adicionan a través de las zonas hidrófobas, normalmente poco accesibles al disolvente, e intentan solubilizarlas, o frente a proteasas que atacan los enlaces de amida de ácido de la estructura principal situados en el interior. También restos de aminoácido oxidables situados en el interior están mejor protegidos por medio de este efecto, por ejemplo contra el oxígeno del aire o agentes de blanqueo.

25 El objetivo planteado se resuelve por consiguiente mediante variantes de α -amilasa con al menos una sustitución de aminoácido con respecto a la molécula de partida, mediante lo cual un resto de aminoácido de la molécula de partida situado sobre la superficie de la molécula y que ejerce una contribución neutra o positivamente polar o de carga positiva al potencial electrostático de la molécula se ha sustituido por un resto de aminoácido más negativamente polar o negativamente cargado, siendo posibles las siguientes sustituciones de aminoácido:

aminoácido de partida	por
Arg (R)	K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Lys (K)	Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Tyr (Y)	C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Cys (C)	H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
His (H)	G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Gly (G)	A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ala (A)	V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Val (V)	L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Leu (L)	I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ile (I)	M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Met (M)	F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Phe (F)	W, P, S, T, N, Q, E o D
Trp (W)	P, S, T, N, Q, E o D
Pro (P)	S, T, N, Q, E o D
Ser (S)	T, N, Q, E o D
Thr (T)	N, Q, E o D
Asn (N)	Q, E o D
Gln (Q)	E o D
Glu (E)	D

35 y encontrándose el resto de aminoácido mencionado en una posición que pertenece a uno de los dos siguientes grupos:

(A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422; o

(B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484,

en cada caso indicados en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2, tratándose en el caso de la molécula de partida de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en un 100 % a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N.º 2 en las posiciones +1 a 484.

- 5 Por α -amilasas en el sentido de la presente solicitud se entiende, tal como se explicó al principio, las enzimas de la clase E.C. 3.2.1.1, que hidrolizan enlaces α -1,4-glicosídicos internos de almidón y polímeros similares a almidón con la formación de dextrinas y oligosacáridos β -1,6-ramificados.

10 Variantes de α -amilasa son aquellas α -amilasas que se han derivado mediante modificaciones de ingeniería genética en sí conocidas a partir de una molécula precursora. "Variante" es, a nivel de las proteínas, el término correspondiente a "mutante" a nivel de los ácidos nucleicos. En el caso de las moléculas precursoras o moléculas de partida puede tratarse de enzimas de tipo salvaje, es decir aquellas que pueden obtenerse de fuentes naturales. Aquéllas se han presentado a modo de ejemplo de manera introductoria. Puede tratarse también enzimas que representan en sí ya variantes, es decir que se han modificado ya con respecto a las moléculas de tipo salvaje. Por estas se entienden por ejemplo mutantes puntuales, aquéllos con modificaciones de la secuencia de aminoácidos, a 15 través de varias posiciones o zonas contiguas más largas, o también moléculas híbridas que se componen de secciones complementarias entre sí de distintas α -amilasas de tipo salvaje. Tanto las enzimas de tipo salvaje como mutantes y enzimas híbridas se han presentado a modo de ejemplo de manera introductoria.

20 Por sustituciones de aminoácido se entiende sustituciones de un aminoácido por otro aminoácido. De acuerdo con la invención, tales sustituciones se indican con el nombre de las posiciones en las que tiene lugar la sustitución, opcionalmente combinado con los aminoácidos en cuestión en el código de una letra de uso internacional. "Sustitución en la posición 83" significa por ejemplo que una variante en la posición que presenta en la secuencia de una proteína de referencia la posición 83, presenta otro aminoácido. Habitualmente tales sustituciones se realizan a nivel del ADN a través de mutaciones de pares de bases individuales (véase anteriormente). "N83D" significa por 25 ejemplo que la enzima de referencia en la posición 83 presenta el aminoácido asparragina, mientras que la variante considerada, en la posición homologable con la misma, dispone del aminoácido ácido aspártico. "83D" significa que cualquier aminoácido, es decir, por regla general, un aminoácido predeterminado de forma natural en una posición, que corresponde a la posición 83, se ha sustituido por un ácido aspártico; y "N83X" significa que el aminoácido asparragina en la posición 83 se ha sustituido, en principio, por cualquier otro aminoácido.

30 En principio, las sustituciones de aminoácido de acuerdo con la invención designadas con la presente solicitud no están limitadas a que sean las únicas sustituciones en las que la variante en cuestión se diferencia de la molécula de tipo salvaje. En el estado de la técnica se conoce que las propiedades ventajosas de mutaciones puntuales individuales pueden complementarse entre sí. Una α -amilasa optimizada con respecto a determinadas propiedades tal como la unión a calcio o la estabilidad frente a tensioactivos, puede perfeccionarse de acuerdo con la invención 35 adicionalmente a través de las sustituciones presentadas en el presente documento. Por lo tanto, las formas de realización de la presente invención comprenden todas las variantes que además de otras sustituciones con respecto a la molécula de tipo salvaje también presentan las sustituciones de acuerdo con la invención.

40 Como enzima de referencia con respecto a la numeración de las posiciones se indica de acuerdo con la invención la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), cuya secuencia de nucleótidos está indicada en la SEC ID N.º 1, seguido de la secuencia de aminoácidos correspondiente en la SEC ID N.º 2. Estos datos de secuencias están corregidos, tal como se explica en el ejemplo 1 de la presente solicitud, con respecto a la descripción en el documento WO 02/10356 A2 en, en cada caso, dos posiciones y corresponden en esta forma, según el estado de conocimiento actual, exactamente a los datos de secuencia que pueden obtenerse a partir de la cepa DSM 12368 depositada y que se describe en el documento WO 02/10356 A2.

45 Esta secuencia de aminoácidos correcta se desprende también de la primera línea de la alineación mostrada en la figura 1, que se ha creado únicamente para las partes maduras de las enzimas respectivas. Esto está justificado porque *in vivo* solo la parte madura (es decir aquella con la numeración positiva en la SEC ID N.º 2) es eficaz como α -amilasa. Para algunas enzimas tal como, por ejemplo, AA349 y AA560, se indican en la bibliografía de patentes (documento WO 00/60060 A2) en todo caso únicamente las partes de secuencia maduras.

50 La superficie de la enzima comprende todos aquellos aminoácidos de la enzima plegada de forma nativa que se han dirigido al disolvente. Éstos son por ejemplo en la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) los 407 aminoácidos que se exponen en detalle en el ejemplo 2.

55 Los aminoácidos de superficie de otras α -amilasas pueden deducirse en principio consultando la alineación de la figura 2. Esto es válido sin embargo solo de manera aproximada. En zonas altamente conservadas y estructuralmente protegidas tal como hélices α o láminas β resulta, por regla general, una buena coincidencia; en zonas más flexibles, en particular bucles, la comparación basada en la alineación, es decir la estructura primaria, va acompañada de incertidumbres. Es decisiva, en todos los casos (siempre que sean conocidos), la estructura de rayos X segura, tal como se ha depositado realmente para la mayoría de las α -amilasas comercialmente importantes entretanto en bancos de datos accesibles en general. Éstos son por ejemplo los bancos de datos GenBank (National

Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.) y Swiss-Prot (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Genf, Suiza; <http://www.genebio.com/sprot.html>).

5 Si, para una molécula de interés no se hubiera determinado aún la estructura 3D (o terciaria), entonces ésta puede deducirse a través de un modelado por homología. En este método para la predicción de estructuras de proteínas, de las que no se ha resuelto aún ninguna estructura cristalina, se parte de que las proteínas con estructura primaria similar tienen también una estructura secundaria y terciaria similar. La similitud entre dos secuencias de proteína puede determinarse a través de un algoritmo adecuado, por ejemplo BLAST, FASTA o CLUSTAL. Tales algoritmos se encuentran así mismo disponibles a través de bancos de datos de proteínas accesibles en general; de este modo, por ejemplo GenBank y Swiss-Prot disponen de enlaces correspondientes. El banco de datos de proteínas RSCB (accesible a través del centro Max-Delbrück en Berlín, Alemania, a través de la dirección de Internet <http://www.pdb.mdc-berlin.de/pdb>; 24.8.2004) ofrece al usuario la posibilidad de encontrar, a través de una búsqueda FASTA, con respecto a una secuencia determinada, estructuras cristalinas de proteínas relacionadas.

15 Los cálculos posibles, que se construyen a partir de ello, por ejemplo con ayuda del denominado visor Swiss-Pdb, se describen en la publicación "SWISS-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling" (1997) de N. Guex y M. C. Peitsch en *Electrophoresis*, tomo 18, páginas 2714 a 2723. Este visor se encuentra accesible de forma gratuita a través de la dirección de Internet <http://us.expasy.org/spdbv/> (24.8.2004) del Organisation Swiss Institute of Bioinformatics (Central Administration, Bâtiment Ecole de Pharmaciroom 3041, Université de Lausanne, 1015 Lausanne, Suiza). El manual correspondiente (SwissPDB-Viewer-Manual) se encuentra disponible en la dirección de Internet <http://us.expasy.org/spdbv/text/selmenu.htm> (24/8/2004). Mediante la yuxtaposición (*superimposition*) de estas estructuras puede crearse además una estructura guía, sobre la que se modela entonces la secuencia de proteínas de la α -amilasa de interés. Las etapas individuales para ello se desprenden del manual para el usuario mencionado.

25 Todas las exposiciones discutidas en este caso de la superficie de una enzima, es decir de la enumeración especial de los aminoácidos de superficie de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368; véase la figura 1) como los planteamientos de modelado expuestos, se basan en un cálculo. A este respecto se hace rotar mediante cálculo una sonda de un tamaño de 1,4 Å a lo largo de la superficie de la proteína. Todas las posiciones que se mencionan allí, se enumeran con respecto a la superficie de contacto con esta sonda y por lo tanto con respecto a la superficie; espacios más estrechos, abiertos teóricamente hacia fuera, ya no se consideran a este respecto como superficie sino que se atribuyen al interior de la molécula. Según este planteamiento, se obtiene la denominada superficie Conolly, que se ha descrito por primera vez por M.L. Connolly en el artículo "Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic Acids" (1983) en *Science*, tomo 221, 709-713. Este procedimiento reconocido es fiable para el experto y sirve, de acuerdo con la invención, para la definición de la superficie de las α -amilasas.

Para la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) resultaron de esta manera los 407 aminoácidos de superficie mencionados, que se exponen individualmente en el ejemplo 2.

35 Los restos de aminoácido situados sobre la superficie de las α -amilasas consideradas y relevantes para la invención son aquéllos que ejercen una contribución neutra o positivamente polar o de carga positiva al potencial electrostático de la molécula a un valor de pH de 7. Una contribución de este tipo al potencial electrostático de la molécula se define como el porcentaje del aminoácido individual con cargas mayores/iguales a cero.

40 El potencial electrostático en un punto determinado de la superficie se define, recurriendo a la superficie Conolly mencionada anteriormente, como el potencial que actúa sobre la sonda mencionada. Este potencial electrostático que reina teóricamente en cada lugar de la superficie puede calcularse mediante algoritmos adecuados, para lo que se realiza de acuerdo con la invención la siguiente reflexión:

45 el campo eléctrico ha de considerarse en principio como la suma de los campos eléctricos parciales generados mediante las cargas individuales. Para un cálculo aprovechable, las cargas individuales se consideran, en una primera aproximación, como cargas puntuales. El campo eléctrico E_i de una carga puntual Q_i puede determinarse a vacío en el sitio r_i a través de la siguiente ecuación (1), en la que ϵ_0 es la constante dieléctrica:

$$(1) \quad \vec{E}_i = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_i}{r_i^2} \hat{r}_i$$

Un conjunto de N cargas da como resultado por lo tanto el siguiente campo eléctrico E:

$$(2) \quad \vec{E} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_i}{r_i^2} \hat{r}_i$$

50 El potencial de Coulomb generado a partir de ahí $V_c(P_1)$ en el punto P_1 en el campo eléctrico E está definido entonces del siguiente modo, representando L el espacio de coordenadas:

$$(3) \quad V_e(P_1) = \int_{\infty}^{P_1} \vec{E} \cdot d\vec{L}$$

Esta ecuación puede interpretarse en palabras de la siguiente manera: el potencial electrostático que reina en el punto P_1 está definido como la diferencia de potencial entre un punto infinitamente distante y el punto P_1 . L es un vector espacial, que en la práctica representa la variable de integración del espacio. El punto P_1 y, por consiguiente, también cada punto adicional relevante, introducido de igual manera en este cálculo, se encuentra a este respecto sobre la superficie de proteína. Con esta fórmula, ordenadores con programas informáticos adecuados para cada punto sobre la superficie de proteína, pueden determinar el potencial electrostático localizado respectivo. De este modo puede asignarse a cada resto de aminoácido una carga o polaridad correspondiente, lo que puede ilustrarse en una representación visual por ejemplo tal como en la figura 1.

El cálculo con esta ecuación (3) da como resultado una aproximación no exacta pero suficiente de acuerdo con la invención del potencial electrostático. En una primera aproximación, la constante dieléctrica ϵ_0 debe sustituirse por la constante dieléctrica real $\epsilon = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r$ como la constante dieléctrica del medio. Este planteamiento se denomina "Screened Coulomb Potential" y se describe por S. A. Hassa y col. (2002) en el artículo "A Critical Analysis of Continuum Electrostatics: The Screened Coulomb Potential-Implicit Solvent Model and the Study of the Alanine Dipeptide and Discrimination of Misfolded Structures of Proteins", en *Proteins*, tomo 45, página 47. Para otros algoritmos más exactos se encuentran en la bibliografía varios ejemplos, tal como, por ejemplo, E. L. Mehler y col. (1991), "Electrostatic effects in proteins: comparison of dielectric and charge models", *Protein Eng.*, tomo 8, páginas 903 - 910, y A. Jakalian y col. (2002) "Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation" en *J. Comput. Chem.*, tomo 16, páginas 1623 - 1641. Para la aplicación descrita en este caso, sin embargo, estos no son necesarios, dado que, finalmente, una predicción semicuantitativa (positiva, neutra, negativa) permite la solución del planteamiento del objetivo.

Los aminoácidos en cuestión pueden calcularse por ejemplo a través de un algoritmo informático, que se encuentra disponible como módulo adicional de ya mencionado visor SwissPDB. En éste, a través de los puntos "Tools", "Compute Molecular Surface", y "Electrostatic potential" puede calcularse la distribución de carga superficial de la molécula examinada, teniéndose en cuenta, entre los parámetros estándar, las cargas parciales de los átomos de cada aminoácido con excepción de los átomos de hidrógeno.

De este modo, tal como está representado en el ejemplo 2, para la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) como cantidad parcial de los 407 restos de aminoácido de superficie determinados previamente se determinan 118 restos que ejercen una contribución positiva o neutra al potencial electrostático de la superficie.

Para designar las sustituciones permitidas en cada caso se considera qué valores de polaridad o cargas tienen en sí las distintas cadenas laterales de aminoácido. Con ello resulta el siguiente orden: R, como cadena lateral de aminoácido más básica y, por regla general, cargada positivamente, seguido de K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E y D, representando D la cadena lateral de aminoácido más ácida y que a pH neutro porta una carga negativa. A partir de aquí se explica la clasificación designada anteriormente, pudiendo partirse de acuerdo con la invención de que al sustituirse aminoácidos de superficie individuales, la estructura de la molécula y los efectos de carga adicionales, prácticamente no desempeñan papel alguno. Si una de estas cadenas laterales de aminoácido portara un porcentaje de carga ligeramente más negativo o ligeramente más positivo de lo que cabría esperar debido a los valores conocidos para el aminoácido libre en general, entonces se parte de acuerdo con la invención de que una cadena lateral de aminoácido nombrada más tarde en este orden, porta en el mismo entorno molecular un porcentaje de carga ligeramente más negativo o ligeramente más positivo de manera correspondiente y, en conjunto, no se modifica el orden mencionado en el presente documento de los aminoácidos permitidos para la sustitución.

La representación en la figura 1 muestra el patrón, calculado según el ejemplo 2, de diferentes polaridades y cargas sobre una superficie de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368). El lado posterior de la molécula que no puede verse en la misma, que contiene también el centro activo, presenta un patrón de carga continuamente negativo. A partir de esto es evidente que pueden formarse dímeros de manera relativamente sencilla, en los que una molécula con una superficie cargada o polarizada positivamente que puede verse en la figura 1 se adiciona a la superficie situada en la parte posterior, cargada/polarizada negativamente de otra molécula y, de esta manera, bloquea su centro activo. Los dímeros de este tipo podrán reconocerse en un peso molecular el doble de alto y/o en una actividad amilasa la mitad de alta en relación con la concentración de proteína total, en cada caso en comparación con una solución correspondiente con monómeros. Con la adición creciente de otras moléculas en la misma orientación caerá adicionalmente la actividad de soluciones correspondientes, hasta que, finalmente, haya precipitado un porcentaje suficientemente agregado de las enzimas como precipitado amorfo y definitivamente se haya desnaturalizado y se haya vuelto inutilizable.

Este proceso deben atravesarlo las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención, que corresponden al número y la localización de las sustituciones de acuerdo con la invención realizadas, visto desde un punto de vista estadístico.

En una forma de realización preferida, en el caso de las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención se trata de aquéllas en las que el resto de aminoácido mencionado antes de la sustitución de aminoácido presenta una accesibilidad de al menos un 10 %, preferentemente al menos un 20 %, de manera especialmente preferente al menos un 30 %, calculándose la accesibilidad del resto de aminoácido en cuestión sobre una escala del 0 % (no accesible al disolvente) al 100 % (contenido en un pentapéptido hipotético GGXGG).

Por la accesibilidad de un resto de aminoácido se entiende de acuerdo con la invención cómo de adecuadamente se encuentra accesible en una conformación natural de la molécula para el disolvente circundante (en la mayoría de los casos agua). Para determinar esta propiedad físico-química se considera una escala del 0 al 100 %, significando un valor del 0 % de accesibilidad que el resto en cuestión no es accesible para el disolvente, y el 100 % representa la accesibilidad posible en un pentapéptido hipotético GGXGG.

De acuerdo con la invención, esta propiedad de las moléculas se refleja en que un resto de aminoácido expuesto, que se despega de la superficie entra más fácilmente en contacto con otras moléculas que uno que es menos accesible para el disolvente. Por lo tanto, tales restos representan puntos de ataque preferidos para la reacción de la presente invención.

A través del ya mencionado visor SwissPDB existe la posibilidad de calcular también estos valores para cada aminoácido de superficie de una proteína globular. El cálculo de la accesibilidad de los aminoácidos se produce allí a través del punto del menú "Select --> Accessible aa", seguido de la entrada de la accesibilidad en porcentaje. Después se seleccionan los aminoácidos correspondientes y pueden mostrarse presionando la tecla "Return". A este respecto es adicionalmente posible automatizar el cálculo a través de un programa de elaboración propia, lo que es tanto más recomendable cuanto más aminoácidos deban incluirse en el cálculo.

Tal como está representado en el ejemplo 2, para la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) se determinaron los siguientes 97 restos de aminoácido, que producen una contribución positiva o neutra al potencial electrostático de la superficie y, al mismo tiempo, presentan un valor para la accesibilidad de al menos el 10 %, estando indicados los valores para la accesibilidad del disolvente en cada caso en % entre paréntesis detrás de las posiciones mencionadas:

T5 (39), N6 (12), G7 (13), N19 (28), N22 (28), N25 (16), R26 (27), R28 (39), S29 (38), S32 (28), N33 (28), K35 (37), K37 (18), Q53 (12), K72 (27), V75 (30), R76 (24), T81 (16), R82 (22), N83 (44), Q84 (24), Q86 (18), A87 (18), T90 (30), A91 (11), K93 (32), S94 (50), N95 (19), G96 (25), Q98 (29), R118 (41), T136 (22), K142 (30), G149 (14), N150 (39), T151 (22), H152 (27), N154 (41), K156 (30), R158 (33), Y160 (20), R171 (32), Q172 (53), R176 (41), R181 (34), R218 (18), T227 (19), G229 (14), K242 (15), R247 (20), T251 (23), R254 (15), K259 (26), N260 (49), K281 (33), N283 (40), R302 (50), R310 (31), R320 (52), T323 (49), R359 (13), Y368 (12), Y372 (37), T376 (56), K383 (19), K385 (37), Q394 (20), K395 (38), G399 (16), K400 (44), Y404 (11), G417 (11), N418 (25), T419 (59), A420 (37), H421 (16), P422 (46), G435 (25), G436 (17), W439 (47), R444 (49), N445 (41), Q449 (31), V450 (24), R452 (33), R458 (24), S459 (52), G460 (32), T461 (35), T463 (40), N465 (22), A466 (37), N471 (20), S473 (10), N475 (25), G476 (31), N484 (12).

Las formas de realización preferidas adicionalmente para esta molécula con respecto a la accesibilidad pueden seleccionarse por medio del valor de porcentaje indicado para la accesibilidad.

Una conversión en otras α -amilasas es posible de manera aproximada a través de un alineamiento tal como en la figura 2. Es decisiva, tal como se ha explicado ya, sin embargo la verdadera estructura tridimensional, por medio de la cual pueden realizarse, tal como se demuestra en el ejemplo para la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), los correspondientes cálculos para la verdadera distribución de carga y la accesibilidad de disolventes.

En otra forma de realización preferida se trata en el caso de las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención de aquellas variantes de α -amilasa, en las que el resto de aminoácido mencionado se encuentra en una zona neutra o positivamente polarizada o cargada de al menos dos restos de aminoácido directamente adyacentes sobre la superficie.

Según esto se realiza por tanto el cálculo explicado anteriormente y se selecciona para la mutagénesis de acuerdo con la invención un aminoácido tal que, adicionalmente a las propiedades mencionadas anteriormente, sea inmediatamente adyacente a un resto exactamente igual sobre la superficie, es decir que no está rodeado exclusivamente por aquellos restos de aminoácido en los que podría realizarse también una sustitución de acuerdo con la invención.

Con ello, por tanto, se somete a una mutación de acuerdo con la invención un aminoácido tal que no se produzca de manera aislada, sino que sea parte de una superficie neutral o positivamente polar o cargada de la molécula. Debido a ello se rompe la disposición a modo de superficie que puede considerarse, tal como se ha explicado anteriormente, especialmente como origen para que las α -amilasas se agreguen a través de interacciones electrostáticas y formen multímeros. Una polaridad o carga positiva aislada debía ejercer, observada de manera estadística, una contribución más baja a la multimerización, dado que ésta debía ejercer menor acción sobre otras moléculas mediante aminoácidos adyacentes cargados más negativamente de manera creciente. Por tanto se

realizan preferentemente sustituciones en zonas anexas, que se presentan de manera neutra o positiva. Tales sustituciones están representadas en negro o en blanco en el ejemplo de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) en la figura 1.

5 En el caso de las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención se trata de aquellas variantes de α -amilasa, en las que el resto de aminoácido que va a mutarse de acuerdo con la invención se encuentra en una posición que pertenece a uno de los dos siguientes grupos:

- (A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422; o
- 10 (B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484,

en cada caso indicados en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.

15 Tal como se describe en el ejemplo 3, pudo modelarse de manera exacta la distribución de carga de superficie para la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368). A este respecto se determinó que los 97 restos de aminoácidos de esta molécula situados sobre la superficie de la molécula y que ejercen una contribución neutra o positivamente polar o de carga positiva al potencial electrostático de la molécula y que presentan adicionalmente una accesibilidad de más de un 10 % pueden asignarse según su posición a tres grupos. Según esto, los restos de los grupos A y B representan en cada caso zonas anexas de carga o polaridad neutra o positiva.

Como grupo A se designan las siguientes 63 posiciones de aminoácidos, estando indicado en cada caso el aminoácido allí existente en la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368):

- 20 T5, N6, G7, N19, N22, N25, R26, R28, S29, S32, N33, K35, K37, Q53, K72, V75, R76, T81, R82, N83, Q84, Q86, A87, T90, A91, K93, S94, N95, G96, Q98, R118, T136, K142, G149, N150, T151, H152, N154, K156, R158, Y160, R171, Q172, R181, T227, G229, R247, T251, R254, K259, N260, K281, N283, Q394, K395, G399, K400, G417, N418, T419, A420, H421, P422.

Al grupo B pertenecen las siguientes 20 posiciones:

- 25 G435, G436, W439, R444, N445, Q449, V450, R452, R458, S459, G460, T461, T463, N465, A466, N471, S473, N475, G476, N484.

Los 14 restos de aminoácido que quedan que se agrupan en el grupo C, pueden considerarse como islas neutras o positivas dentro de las zonas por lo demás cargadas o polarizadas negativas:

- 30 R176 (41), R218 (18), K242 (15), R302 (50), R310 (31), R320 (52), T323 (49), R359 (13), Y368 (12), Y372 (37), T376 (56), K383 (19), K385 (37), Y404 (11).

35 En el caso de los restos de aminoácido mencionados en último lugar puede partirse de la base de una contribución más bien baja a la tendencia a la agregación de toda la molécula. Tanto más debieran provocar las zonas anexas A y B la multimerización, cuanto más debiera ejercerse un efecto electrostático más fuerte que provocara la disposición de varias moléculas, que conduce a la agregación tal como se supone de acuerdo con la invención con respecto a la tendencia observada. Por tanto se realizan las sustituciones de aminoácido de acuerdo con la invención en estas zonas anexas A y/o B.

40 Para en principio cualquier otra α -amilasa establecida en el estado de la técnica pueden realizarse las mismas consideraciones y cálculos que en el ejemplo de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368). En particular en estas posiciones concretas se indica la comparación más sencilla de las correspondientes secuencias de aminoácidos a través de un alineamiento. Las respectivas α -amilasas pueden homologarse con la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368). Un alineamiento de este tipo se muestra por ejemplo en la figura 2 para las α -amilasas más importantes establecidas en el estado de la técnica; la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2 corresponde a la línea 1 en la figura 2. A través de un alineamiento de este tipo pueden deducirse las posiciones preferentes para las sustituciones, mencionadas en el presente documento para la enzima

45 de interés en cada caso, que pueden modificarse al menos de manera aproximada con igual resultado que con la enzima considerada en el presente documento. Tal como se ha explicado ya, por último, es decisiva sin embargo la situación existente de manera concreta en cada caso en la enzima respectiva.

50 En otra forma de realización preferida, en el caso de las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención se trata de aquellas variantes de α -amilasa, en las que se han realizado varias de las sustituciones de aminoácido mencionadas, preferentemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, de manera especialmente preferente entre 10 y 30 y de manera muy especialmente preferente entre 15 y 25.

Por lo tanto, la solución del presente objetivo tiene como base la observación de que algunas α -amilasas forman agregados amorfos, y como posible aclaración para esto se consideró la existencia de zonas más grandes planas

cargadas o polarizadas de distinta manera. Al mismo tiempo se conocen por el estado de la técnica α -amilasas que presentan cargas de superficie predominantemente negativas. Por tanto es ventajoso convertir también más de únicamente un resto de acuerdo con la invención en un resto de aminoácido más negativamente polar o negativamente cargado.

- 5 A este modo de proceder se le establece, de manera correspondiente a la naturaleza de las enzimas, un límite superior individual que debe determinarse opcionalmente de manera experimental. Así, una molécula que está saturada con muchas cargas negativas debería apartarse mucho del sustrato y debido a ello perder actividad. Además, demasiadas cargas pueden repercutir también de manera desfavorable en el plegamiento, de modo que a partir de un valor crítico se formarían muchas moléculas sin plegar y por tanto no activas.
- 10 Al menos para la α -amilasa de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) ha resultado por tanto ventajoso limitar el número de sustituciones de acuerdo con la invención a menos de 30, pudiéndose considerar ventajoso absolutamente más de 10. Para las α -amilasas que pueden homologarse con esto, por ejemplo aquéllas de la figura 2 y en particular aquéllas que en las posiciones homólogas llevan así mismo aminoácidos neutros o cargados o polarizados positivamente, ha de esperarse un resultado similar.
- 15 En otra forma de realización preferida, en el caso de las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención se trata de aquellas variantes de α -amilasa, en las que en al menos una a como máximo exactamente tantas otras posiciones se ha sustituido o se han sustituido uno o varios restos de aminoácido de la molécula de partida distintos situados sobre la superficie de la molécula por restos de aminoácido menos negativamente polares o negativamente cargados, siendo posibles en cada caso las siguientes sustituciones de aminoácido:

Aminoácido de partida	por
K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Arg (R)
Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Lys (K)
C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Tyr (Y)
H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Cys (C)
G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	His (H)
A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Gly (G)
V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Ala (A)
L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Val (V)
I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Leu (L)
M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Ile (I)
F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Met (M)
W, P, S, T, N, Q, E o D	Phe (F)
P, S, T, N, Q, E o D	Trp (W)
S, T, N, Q, E o D	Pro (P)
T, N, Q, E o D	Ser (S)
N, Q, E o D	Thr (T)
Q, E o D	Asn (N)
E o D	Gln (Q)
D	Glu (E)

- 20 Mediante esta mutación opuesta a la verdadera invención se atenúa de nuevo el efecto de carga introducido de acuerdo con la invención. Debido a ello se persiguen dos objetivos: por un lado tal como se ha mencionado anteriormente, en particular cuando se realizan varias mutaciones de acuerdo con la invención (de acuerdo con la invención se consideran especialmente convenientes hasta 30), la molécula de α -amilasa puede obtener una carga
- 25 negativa en total muy fuerte, de modo que pudieran alterarse la estabilidad y la reactividad. En este sentido puede ser oportuno, en particular cuando se realizan varias mutaciones, debilitar de nuevo en total su efecto de carga.

- Por otro lado se rompe debido a ello la planitud de la distribución de carga sobre la superficie de la enzima. Esta planitud, tal como se ha explicado anteriormente, se consideró como un motivo esencial para la multimerización. Cuando ahora con carga total constante en total o solo insignificamente modificada se consigue una modificación
- 30 del patrón de carga hacia un patrón más descompactado, ha de contarse así mismo con una reducción de la tendencia a la agregación, ya que las moléculas ya no se disponen una con respecto a otra de manera automática como imanes en orientación regular.

- Para la designación de las sustituciones permitidas en cada caso se recurre a la consideración explicada ya anteriormente de qué valores de polaridad o cargas tienen en sí las distintas cadenas laterales de aminoácido.
- 35 Debido a ello resulta exactamente el orden inverso, ya que R, como la cadena lateral de aminoácido más básica y por regla general cargada positivamente para provocar una polaridad o carga más bien positiva no puede sustituirse por otra, sin embargo incluso puede ponerse en el sitio de cualquier otra. Esto se aplica en correspondiente escala para K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E y D, representando D la cadena lateral de aminoácido más ácida, portando con valor de pH neutro por regla general una carga negativa y pudiéndose sustituir bajo este
- 40 aspecto de la invención por cualquier otra, incluyendo E.

En otra forma de realización preferida, en el caso de las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención se trata de aquellas variantes de α -amilasa, en las que se ha realizado o se han realizado la sustitución o las sustituciones realizada o realizadas para la reducción de la variación de carga total en la posición o en las posiciones de aminoácidos que no pertenece o no pertenecen a las siguientes:

- 5 (A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422 o
(B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484 o
(C) 176, 218, 242, 302, 310, 320, 323, 359, 368, 372, 376, 383, 385 y 404,

10 en cada caso indicadas en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.

En esta forma de realización preferida se retoma el conocimiento obtenido en la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), según el cual estos restos de aminoácido que van a asignarse a las zonas A y B forman zonas extensas cargadas o polarizadas neutral o positivamente y los restos mencionados en (C) forman islas cargadas o polarizadas neutral o positivamente dentro de un entorno predominantemente negativo. Dado que, tal como se ha explicado anteriormente, bajo el aspecto de la invención considerado en el presente documento debe romperse justamente la planitud de la distribución de carga, es especialmente conveniente seleccionar para la mutación inversa de compensación de carga otras posiciones distintas de las designadas en el presente documento, ya que debido a ello aumentaría de nuevo las mencionadas regiones cargadas o polarizadas neutral o positivamente.

En otra forma de realización preferida, las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención son aquellas variantes de α -amilasa, en las que en el caso de la molécula de partida se trata de la siguiente α -amilasa: α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368).

Tal como se ha descrito anteriormente, se han establecido en el estado de la técnica numerosas α -amilasas para su uso para distintos fines técnicos. A esto pertenecen por ejemplo enzimas fúngicas y bacterianas.

Para fines técnicos son especialmente habituales aquellas α -amilasas de bacterias Gram positivas, en particular del género *Bacillus*, que se adaptan a un medio alcalino, ya que presentan desde el principio propiedades favorables para estos campos de uso. De manera correspondiente a esto, la presente invención se refiere a la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), conocida por el documento WO 02/10356 A2 y la presente solicitud.

Adicionalmente se han descrito en el estado de la técnica numerosas variantes de α -amilasa derivadas mediante mutagénesis de aminoácidos individuales o varios en las mencionadas α -amilasas. En todas éstas puede aplicarse así mismo la presente invención, partiéndose en principio de que los respectivos efectos son aditivos. Así debería poder mejorarse una variante de α -amilasa, que es especialmente eficaz debido a una determinada sustitución de aminoácido en un campo de aplicación especial, mediante la realización de una mutación de acuerdo con la invención adicionalmente a este aspecto de eficacia también en su tendencia a la agregación. Preferentemente se trata por tanto de variaciones de aminoácidos, para las que se ha descrito ya una correspondiente ventaja.

Según esto, no desempeña en principio ningún papel en qué orden se han realizado las respectivas sustituciones, es decir si se desarrolla un correspondiente mutante puntual de acuerdo con la invención o en primer lugar se genera por ejemplo a partir de una molécula de tipo salvaje una variante de acuerdo con la invención que se desarrolla de manera correspondiente a otras enseñanzas que se encuentran en el estado de la técnica. Pueden realizarse también al mismo tiempo en un planteamiento de mutagénesis varias sustituciones, por ejemplo de acuerdo con la invención y otras conjuntamente. Esta situación se produce por ejemplo cuando una α -amilasa se desarrolla con procedimientos de mutagénesis de acción estadística, tal como por ejemplo mediante agentes de mutagenización o transposición. Esto se aplica para cualquier tipo de modificación de las respectivas enzimas, en particular para mutaciones puntuales, que actúan en principio independientemente entre sí.

Las α -amilasas especialmente eficaces, que pueden obtenerse mediante mutaciones puntuales se deducen por ejemplo de la solicitud WO 00/60060 A2, que describe por medio de la amilasa AA560 (la misma numeración que la proteína madura en la SEC ID N.º 2) numerosas mutaciones en las posiciones 181, 182, 183, 184, 195, 206, 212, 216 y 269. Esta solicitud puede considerarse como desarrollo del documento WO 96/23873 A1 que había descrito ya la posibilidad de la mutagénesis puntual para la mejora de la eficacia en las posiciones 180, 181, 182, 183, 184 y 185. La solicitud WO 00/60059 A2 menciona otras mejoras de las enzimas designadas en el presente documento como amilasas similares a Termamyl; según esto son las posiciones 13, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 107, 108, 111, 168 y 197 (en la numeración de la α -amilasa de *B. licheniformis*) puntos de partida adecuados para ello. En el caso de la molécula de partida se trata de α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368).

Así se representa la invención descrita en el presente documento en los ejemplos de la presente solicitud en particular por medio de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), cuyas secuencias de ADN y aminoácidos con toda probabilidad correctas están mostradas en el protocolo de secuencias de la presente solicitud. Esta enzima de tipo salvaje tiene en comparación con otras α -amilasas establecidas las ventajas descritas en la solicitud WO 02/10356 A2 con respecto a su uso en agentes de lavado y de limpieza. Con la ciclodextrina-glucanotransferasa de

B. agaradherens (DSM 9948) se ha mencionado ya anteriormente otra molécula de partida que, tal como se describe en la solicitud WO 02/44350 A2, hace así mismo especiales contribuciones a la eficacia total de agentes de lavado y de limpieza en comparación con otras enzimas.

5 Las amilasas híbridas de las α -amilasas de *B. amiloliquefaciens* y *B. licheniformis* se describen en la solicitud WO 03/014358 A2. Entre éstas han mostrado las moléculas designadas con los acrónimos AL34, AL76, AL112, AL256, ALA34-84, LAL19-153 o LAL19-433 eficacias especialmente ventajosas en su uso en agentes de lavado y de limpieza. Los respectivos nombres designan los elementos, de los que están compuestas en cada caso, observados desde el extremo N-terminal, representando A la α -amilasa de *B. amiloliquefaciens* y representando L la α -amilasa de *B. licheniformis* y el siguiente número indica el punto de transición de una secuencia de aminoácidos en otra. Otros detalles con respecto a esto pueden deducirse de la mencionada solicitud.

10 Las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención son aquellas variantes de α -amilasa, en las que en el caso de la molécula de partida se trata de una α -amilasa, cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en un 100 % a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N.º 2 en las posiciones +1 a 484.

15 Esta α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) se describe detalladamente en la solicitud de patente internacional WO 02/10356 A2 mencionada ya varias veces. Con respecto a esto se menciona que la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos derivada de la misma de la α -amilasa que puede obtenerse de esta cepa presentan con toda probabilidad las secuencias indicadas en la SEC ID N.º 1 o 2 de la presente solicitud. Esto es una corrección con respecto a las secuencias indicadas en la solicitud WO 02/10356 A2. También los ensayos descritos en aquella solicitud se han realizado con la α -amilasa nativa que puede obtenerse de esta cepa.

20 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N.º 1 permite al experto directamente realizar las mutaciones de acuerdo con la invención. Quien haya preparado un ADN que codifica para α -amilasa según el protocolo de secuencias del documento WO 02/10356 A2, en lugar de recurrir a los microorganismos depositados, puede transformar éste con ayuda de procedimientos sencillos de mutagénesis puntual, tal como se mencionan también en los ejemplos de la presente solicitud, en una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N.º 1 de la presente solicitud.

25 Las posibilidades de cultivo del correspondiente microorganismo, la purificación y la caracterización enzimática de la α -amilasa de tipo salvaje se conocen así mismo a partir de aquella solicitud y se resumen en el ejemplo 1 de la presente solicitud otra vez. Las variantes de esta enzima de acuerdo con la invención pueden obtenerse y purificarse en principio de igual manera, pudiéndose considerar las diferencias introducidas de acuerdo con la invención (por ejemplo con la consideración del punto isoeléctrico (IEP)). Por ejemplo, el IEP debería desplazarse aproximadamente en el intervalo ácido.

Además se prefieren aquellas variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención, en las que en el caso de la molécula de partida se trata de una variante de α -amilasa con, con preferencia creciente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones puntuales adicionales.

35 Las secuencias indicadas en la SEC ID N.º 1 y 2 se diferencian, tal como se explica en el ejemplo 1, en respectivamente dos posiciones de las indicadas en el documento WO 02/10356 A2. Éstas representan según el nivel de conocimiento actual las mejores descripciones de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) y por consiguiente son puntos de partida especialmente preferentes para la introducción de sustituciones de aminoácido de acuerdo con la invención.

40 Además, correspondientemente a lo dicho anteriormente, puede partirse de la base de que en principio cualquier α -amilasa con mutaciones puntuales individuales, es decir deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos individuales puede mejorarse con respecto a otros aspectos. Así, tal como se ha descrito ya anteriormente, de las solicitudes WO 00/22103 A1, WO 96/23873 A1, WO 00/60060 A2 y WO 01/66712 A2 resultan las variantes de α -amilasa mutagenizadas en posiciones individuales que se han mejorado en cada caso con respecto a aspectos especiales. Dado que éstas presentan en parte altos valores de homología con respecto a esta amilasa mostrada en la SEC ID N.º 2, es decir pueden designarse como altamente similares, ha de esperarse que puedan transferirse las sustituciones designadas en el presente documento con las mismas repercusiones ventajosas también sobre estas moléculas así como de manera análoga también sobre otras α -amilasas. Otras posibles modificaciones pueden deducirse del estado de la técnica, tal como está resumido éste por ejemplo en la introducción a la presente solicitud.

Además formas de realización preferentes de la presente invención son variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención con las mutaciones puntuales adicionales en una o varias de las siguientes posiciones: 5, 167, 170, 177, 202, 204, 271, 330, 377, 385 y 445, en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.

55 Así resulta de la solicitud de patente alemana no publicada previamente DE 10309803.8 que en las posiciones -19, 5, 167, 170, 177, 204, 271, 330, 377, 385 y/o 445 (o 13, 32, 194, 197, 203, 230, 297, 356, 406, 414 y 474 de acuerdo con la numeración de la α -amilasa no procesada de *B. amiloliquefaciens*) pueden realizarse mutaciones puntuales

para la mejora de la actividad alcalina de α -amilasas. Preferentemente se usa la presente invención por tanto en estas moléculas ya mejoradas.

5 Las variantes de α -amilasa estabilizadas frente a la oxidación resultan de la solicitud WO 94/18314 A1, entre éstas sobre todo en posición 197 (en la numeración de la α -amilasa de *B. licheniformis*), que corresponde a la posición 202 de la α -amilasa de acuerdo con la SEC ID N.º 2. Las variantes de acuerdo con la invención pueden estabilizarse mediante las sustituciones mencionadas en el presente documento, sobre todo en la posición 202 adicionalmente frente a la oxidación. Esta sustitución es también por tanto especialmente interesante, ya que en el caso de M202 en la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) se trata del único resto de metionina que es accesible con un valor de accesibilidad del 30 % para el disolvente en más del 10 % (ejemplo comparativo 2). Mediante esto se explica su especial sensibilidad a la oxidación así como la relación con la presente invención.

10 Ciertas formas de realización preferentes de esto las representan aquellas variantes de α -amilasa, en las que en el caso de las enzimas de partida se trata de las siguientes mutaciones puntuales: 5A, 167R, 170P, 177L, 202L, 204V, 271 D, 330D, 377R, 385S y/o 445Q.

15 Así se describen las variaciones de secuencias (-19P, 5A, 167R, 170P, 177L, 204V, 271 D, 330D, 377R, 385S y 445Q (o en la numeración de la α -amilasa no procesada de *B. licheniformis* la sustituciones por 13P, 32A, 194R, 197P, 203L, 230V, 297D, 356D, 406R, 414S y 474Q)) en la solicitud DE 10309803.8 mencionada como sustituciones preferentes.

20 En el documento WO 94/18314 A1 se representa especialmente la acción estabilizadora frente a la oxidación de la sustitución M197L, que corresponde a la sustitución de aminoácido M202L de acuerdo con la SEC ID N.º 2. Por consiguiente, las variantes de acuerdo con la invención pueden estabilizarse frente a la oxidación adicionalmente en particular mediante esta mutación puntual.

25 Otro objeto de la presente invención lo forman procedimientos para aumentar la estabilidad de una α -amilasa frente a una dimerización y/o multimerización mediada por interacciones electrostáticas, mediante lo cual al menos un resto de aminoácido de la molécula de partida situado sobre la superficie de la molécula y que ejerce una contribución neutra o positivamente polar o de carga positiva al potencial electrostático de la molécula se ha sustituido por un resto de aminoácido más negativamente polar o negativamente cargado, siendo posibles las siguientes sustituciones de aminoácido:

Aminoácido de partida	por
Arg (R)	K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Lys (K)	Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Tyr (Y)	C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Cys (C)	H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
His (H)	G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Gly (G)	A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ala (A)	V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Val (V)	L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Leu (L)	I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ile (I)	M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Met (M)	F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Phe (F)	W, P, S, T, N, Q, E o D
Trp (W)	P, S, T, N, Q, E o D
Pro (P)	S, T, N, Q, E o D
Ser (S)	T, N, Q, E o D
Thr (T)	N, Q, E o D
Asn (N)	Q, E o D
Gln (Q)	E o D
Glu (E)	D

30 y encontrándose el resto de aminoácido mencionado en una posición que pertenece a uno de los dos siguientes grupos:

- (A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422; o
- (B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484,

35 en cada caso indicados en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2, tratándose en el caso de la molécula de partida de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en un 100 % a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N.º 2 en las posiciones +1 a 484.

De acuerdo con la invención, por la tendencia a la formación de agregados de α -amilasa amorfos se entiende la formación de dímeros, trímeros o agregados de más moléculas de α -amilasa individuales. Dado que mediante esto de la respectiva preparación de enzimas, tal como se ha explicado anteriormente considerada macroscópicamente, se pierde una proporción considerable de actividad, se entiende esto como un aspecto de estabilidad. Aquel procedimiento que contrarresta la agregación, es por consiguiente uno que aumenta la estabilidad de la respectiva preparación de enzimas con respecto a su actividad total.

El planteamiento de acuerdo con la invención para solucionar este problema consiste, tal como se ha explicado ya igualmente, en limitar la multimerización mediada por interacciones electrostáticas. Esto se realiza debido a que se modifican las cargas y los portadores de polaridad situados sobre la superficie de la α -amilasa, y a decir verdad hacia polaridades menos neutras o menos positivas, es decir hacia polaridades y cargas más bien negativas. Según esto, tal como se ha explicado ya y tal como se retoma más abajo otra vez, se prefieren sustituciones en determinadas regiones y determinadas posiciones.

Los procedimientos para la producción de variantes de enzima los conoce en sí un biotecnólogo. Éste recurre a este respecto en particular a los ácidos nucleicos que codifican para las respectivas enzimas de partida, que de manera correspondiente al aminoácido que va a introducirse se muta en el correspondiente codón.

El principio para esto se pone de manifiesto también por el ejemplo 3: por ejemplo con ayuda del kit QuikChange (empresa Stratagene, n.º de catálogo 200518) se sintetizan cebadores, según el correspondiente protocolo, que cubren la zona que va a mutarse y que contienen la mutación que va a introducirse (cebadores de apareamiento erróneo). Las secuencias de cebadores se diseñan por medio de la correspondiente secuencia de nucleótidos considerando el código genético universal. Según esto, para la generación de una carga o polaridad menos neutra o positiva, tal como se ha explicado ya anteriormente, son posibles las sustituciones de aminoácido correspondientemente escalonadas. Según este principio se mutageniza correspondientemente de manera adecuada un vector de expresión que contiene la secuencia de α -amilasa y según procedimientos generalmente conocidos se transforma en una cepa de expresión adecuada para la expresión de la amilasa. Dado que la variante presenta en comparación con la molécula de partida por regla general solo algunas sustituciones, puede orientarse en el caso de la elección del sistema de expresión, de los procedimientos de cultivo y de los procedimientos de procesamiento con los sistemas establecidos para la molécula de partida. A este respecto ha de considerarse que de acuerdo con la invención se modifican las propiedades electrostáticas de las α -amilasas. Una modificación correspondiente a esto del IEP puede comprobarse por ejemplo con ayuda de un enfoque isoeléctrico.

Por lo demás se aplican de manera correspondiente las afirmaciones realizadas anteriormente con respecto a las respectivas enzimas. Esto se aplica de manera correspondiente también para las formas de realización preferentes, es decir para aquellos procedimientos de acuerdo con la invención, con los que se obtienen las variantes descritas ya anteriormente como de acuerdo con la invención.

De manera correspondiente a lo dicho anteriormente, en el caso de los procedimientos preferentes de acuerdo con la invención se trata de aquéllos en los que el resto de aminoácido mencionado antes de la sustitución de aminoácido presenta una accesibilidad de al menos un 10 %, preferentemente al menos un 20 %, de manera especialmente preferente al menos un 30 %, calculándose la accesibilidad del resto de aminoácido en cuestión sobre una escala del 0 % (no accesible al disolvente) al 100 % (contenido en un pentapéptido hipotético GGXGG).

De manera correspondiente a lo dicho anteriormente, en el caso de los procedimientos más preferentes de acuerdo con la invención se trata de aquéllos en los que el resto de aminoácido mencionado se encuentra en una zona neutra o positivamente polarizada o cargada de al menos dos restos de aminoácido directamente adyacentes sobre la superficie.

De manera correspondiente a lo dicho anteriormente, en el caso de los procedimientos más preferentes de acuerdo con la invención se trata de aquéllos en los que se llevan a cabo varias de las sustituciones de aminoácido mencionadas, preferentemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, de manera especialmente preferente entre 10 y 30 y de manera muy especialmente preferente entre 15 y 25.

De manera correspondiente a lo dicho anteriormente, en el caso de los procedimientos más preferentes de acuerdo con la invención se trata de aquéllos según los cuáles en al menos una a como máximo exactamente tantas otras posiciones se ha sustituido o se han sustituido uno o varios restos de aminoácido de la molécula de partida distintos situados sobre la superficie de la molécula por restos de aminoácido menos negativamente polares o negativamente cargados, siendo posibles en cada caso las siguientes sustituciones de aminoácido:

Aminoácido de partida	por
K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Arg (R)
Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Lys (K)
C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Tyr (Y)
H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Cys (C)
G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	His (H)

(continuación)

Aminoácido de partida	por
A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Gly (G)
V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Ala (A)
L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Val (V)
I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Leu (L)
M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Ile (I)
F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Met (M)
W, P, S, T, N, Q, E o D	Phe (F)
P, S, T, N, Q, E o D	Trp (W)
S, T, N, Q, E o D	Pro (P)
T, N, Q, E o D	Ser (S)
N, Q, E o D	Thr (T)
Q, E o D	Asn (N)
E o D	Gln (Q)
D	Glu (E)

Según esto es en principio insignificante si se realiza en primer lugar la sustitución de acuerdo con la invención o en primer lugar esta sustitución que compensa la carga.

- 5 Entre estos se prefieren, de manera correspondiente a lo dicho anteriormente, procedimientos en los que se ha realizado la sustitución o se han realizado la sustitución o las sustituciones realizadas para la reducción de la variación de carga total en posición o posiciones de aminoácido que no pertenece o no pertenecen a las siguientes:

- 10 (A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422 o
 (B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484 o
 (C) 176, 218, 242, 302, 310, 320, 323, 359, 368, 372, 376, 383, 385 y 404,

en cada caso indicadas en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.

- 15 De manera correspondiente a lo dicho anteriormente, en el caso de los procedimientos más preferentes de acuerdo con la invención se trata de aquéllos en los que en el caso de la molécula de partida se trata de α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) y/o de una α -amilasa derivada de esto mediante mutagénesis de aminoácidos individuales o varios.

- 20 Entre éstos se prefieren, de manera correspondiente a lo dicho anteriormente, procedimientos en los que en el caso de la molécula de partida se trata de una variante de α -amilasa con, con preferencia creciente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones puntuales adicionales.

De manera correspondiente a lo dicho anteriormente, en el caso de los procedimientos más preferentes de acuerdo con la invención se trata de aquéllos en los que la α -amilasa introducida es una variante de α -amilasa con las mutaciones puntuales adicionales en una o varias de las siguientes posiciones: 5, 167, 170, 177, 202, 204, 271, 330, 377, 385 y 445, en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.

- 25 En el presente documento se indica también otra vez que en caso de mutantes como moléculas de partida que pueden usarse de acuerdo con la invención en principio no desempeña ningún papel si la sustitución de aminoácido de acuerdo con la invención se realiza tras o antes de la introducción de las otras sustituciones conocidas por el estado de la técnica.

- 30 Entre éstos se prefieren, de manera correspondiente a lo dicho anteriormente, procedimientos en los que se trata de las siguientes mutaciones puntuales: 5A, 167R, 170P, 177L, 202L, 204V, 271 D, 330D, 377R, 385S y/o 445Q.

Otro objeto de la presente invención lo forman ácidos nucleicos que codifican para una de las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención descritas anteriormente.

- 35 Por esto ha de entenderse tanto moléculas de ARN como también de ADN así como análogos de ADN, tanto de la cadena codificante como también de la cadena codogénica, y a decir verdad en cualquier marco de lectura, ya que es posible aprovechar la enseñanza asociada a la invención para realizar a través de un correspondiente ARN interferente una regulación de las correspondientes α -amilasas o aumentar la durabilidad de la información genética, transfiriéndose ésta en un análogo de ADN que puede degradarse lentamente *in vivo*. Los ácidos nucleicos brindan a la presente invención por así decirlo la dimensión de biología molecular, tal como puede distinguirse en los objetos de la invención expuestos a continuación. Éstos se prefieren correspondientemente, de manera correspondiente a lo
 40 dicho anteriormente.

Preferentemente ha de entenderse por esto moléculas de ADN, puesto que a través de éstas es posible preparar las

variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención por medio de procedimientos de biología molecular en sí conocidos y/u opcionalmente modificarlas posteriormente. Para las variantes de α -amilasas mencionadas anteriormente, establecidas en el estado de la técnica están depositadas las secuencias de nucleótidos en bancos de datos generalmente conocidos (por ejemplo Genbank o Swissprot; véase anteriormente) o se deducen de las publicaciones mencionadas. Estas secuencias representan puntos de partida correspondientemente preferentes para la introducción de las mutaciones puntuales de acuerdo con la invención.

Los puntos de partida para este ácido nucleico pueden ser también la información de secuencias indicada en el protocolo de secuencias, en particular para derivados de la α -amilasa de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368). Otra alternativa consiste en realizar una preparación de ADN total de determinados microorganismos tomados en consideración para ello y aislar los genes endógenos de α -amilasa a través de PCR. Como cebadores pueden usarse en principio los fragmentos de secuencia 5' y 3' que van a leerse así mismo de la SEC ID N.º 1.

Los fragmentos puros que codifican para proteínas pueden mutagenizarse por ejemplo también a través de una PCR, es decir pueden modificarse de acuerdo con la invención en su secuencia. Para ello se realiza una PCR con una tasa de error estadística correspondiente, se clona el producto de PCR y se verifican las mutaciones introducidas mediante secuenciación posterior.

Se prefiere con esto un ácido nucleico que se deriva de un ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N.º 1, o de una variante del mismo con, con preferencia creciente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones puntuales adicionales con respecto a aquellas mutaciones que conducen a una de las sustituciones de aminoácido definidas anteriormente como de acuerdo con la invención, con lo que se quiere decir aquéllas mediante las cuales se ha sustituido al menos un resto de aminoácido de la molécula de partida situado sobre la superficie de la molécula y que ejerce una contribución neutra o positivamente polar o de carga positiva al potencial electrostático de la molécula por un resto de aminoácido más negativamente polar o negativamente cargado, considerándose la prioridad expuesta de las sustituciones de aminoácido permitidas, o las sustituciones de compensación descritas en al menos una posición hasta como máximo exactamente muchas otras posiciones de uno o varios otros restos de aminoácido de la molécula de partida situados sobre la superficie de la molécula por restos de aminoácido menos negativamente polares o negativamente cargados, considerándose la prioridad correspondientemente opuesta de las sustituciones de aminoácido permitidas.

Por lo tanto, tal como se ha explicado anteriormente, pueden introducirse distintas mutaciones puntuales en moléculas de α -amilasa, que pueden ejercer en principio acciones ventajosas independientemente entre sí. Así pueden realizarse sustituciones de acuerdo con la invención en aquellas moléculas que se han mejorado en particular con respecto a aspectos especiales de eficacia, a la estabilidad o por ejemplo a la alergenicidad. A esto pertenecen en particular también mutaciones puntuales no de acuerdo con la invención. Este planteamiento para la generación finalmente de sustituciones de aminoácido de acuerdo con la invención se basa en los correspondientes ácidos nucleicos, siendo básicamente irrelevante de manera técnica en qué orden se realizan estas diversas mutaciones.

Otro objeto de la presente invención lo forman vectores que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención designado anteriormente.

Por lo tanto para tratar a los ácidos nucleicos relevantes de la invención y con ello realizar en particular los procedimientos de acuerdo con la invención y preparar la producción de proteínas de acuerdo con la invención se ligan éstas de manera adecuada en vectores. Tales vectores así como los correspondientes procedimientos de trabajo se describen en detalle en el estado de la técnica. Los vectores pueden obtenerse comercialmente en gran número y gran anchura de variación, tanto para la clonación como también para la expresión. A esto pertenecen por ejemplo vectores que se derivan de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos o de virus, o vectores predominantemente sintéticos. Además se diferencian según el tipo de células, en las que pueden establecerse, por ejemplo en vectores para bacterias Gram negativas, para bacterias Gram positivas, para levaduras o para eucariotas superiores. Éstos forman puntos de partida adecuados por ejemplo para estudios de biología molecular y bioquímicos, para la mutagénesis de los fragmentos de ácido nucleico contenidos así como para la expresión del gen en cuestión o de la correspondiente proteína. En particular para la producción de constructos para la delección o refuerzo de la expresión, éstos son prácticamente indispensables (tal como se deduce del estado de la técnica pertinente para ello).

Los vectores son especialmente adecuados para realizar variaciones de secuencia de acuerdo con la invención, por ejemplo a través de mutagénesis dirigida al sitio, tal como se representa esto en el ejemplo 3.

En una forma de realización, en el caso de vectores de acuerdo con la invención se trata de vectores de clonación.

Puesto que los vectores de clonación son adecuados, además de para el almacenamiento, la amplificación biológica o la selección del gen de interés, para su caracterización de biología molecular. Al mismo tiempo, éstos representan formas transportables y con capacidad de almacenamiento de los ácidos nucleicos reivindicados y son también puntos de partida para técnicas de biología molecular que no están unidas a células, tales como por ejemplo la PCR o procedimientos de mutagénesis *in vitro*.

Por ejemplo puede convertirse un vector de clonación, que porta el gen para una α -amilasa descrita en el estado de la técnica, mediante realización de una mutación de acuerdo con la invención en un vector de clonación de acuerdo con la invención.

Preferentemente, en el caso de vectores de acuerdo con la invención se trata de vectores de expresión.

5 Por lo tanto, los vectores de expresión de este tipo son la base para realizar los correspondientes ácidos nucleicos en sistemas de producción biológicos y con ello producir las correspondientes proteínas, dado que permiten *in vivo* la transcripción y traducción, es decir la síntesis del producto génico en cuestión. Las formas de realización preferentes de este objeto de la invención son vectores de expresión que llevan los elementos genéticos necesarios para la expresión, por ejemplo el promotor natural, localizado originariamente delante de este gen o un promotor de otro organismo. Estos elementos pueden estar dispuestos por ejemplo en forma de un denominado casete de expresión. Como alternativa pueden proporcionarse algunos o todos los elementos de regulación también por la respectiva célula huésped. De manera especialmente preferente, los vectores de expresión están adaptados con respecto a otras propiedades, tales como por ejemplo el número de copias óptimo, al sistema de expresión seleccionado, en particular la célula huésped (véase a continuación).

15 Por regla general, la facilitación de un vector de expresión es la mejor posibilidad de formar de manera amplificada una proteína de acuerdo con la invención preferentemente en combinación con proteínas de acuerdo con la invención que interaccionan con ésta y por consiguiente de aumentar la respectiva actividad o poner al alcance una producción cuantitativa.

20 Un propio objeto de la invención lo forman las células que después de la modificación mediante ingeniería genética contienen uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención designados anteriormente.

Por lo tanto, estas células contienen la información genética para la síntesis de una proteína de acuerdo con la invención y se usan entonces en procedimientos de acuerdo con la invención cuando se obtienen biotecnológicamente las α -amilasas en cuestión. Entre ellas se consideran en particular aquellas células que se han dotado de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención según procedimientos en sí conocidos, o las que se derivan de tales células. Para ello se seleccionan de manera adecuada aquellas células huésped que pueden cultivarse de manera comparativamente fácil y/o proporcionan altos rendimientos de producto.

25 Estas permiten por ejemplo la amplificación de los correspondientes genes, sin embargo también su mutagénesis, cuando se realiza un procedimiento de mutagénesis *in vivo*, o la transcripción y la traducción y por último la producción biotecnológica de las proteínas en cuestión. Esta información genética puede encontrarse o bien extracromosómicamente como elemento genético propio, es decir en caso de bacterias en localización plasmídica o puede estar integrada en un cromosoma. La elección de un sistema adecuado depende de las cuestiones, como por ejemplo el tipo y la duración del almacenamiento del gen, o del organismo o el tipo de mutagénesis o selección. Las posibilidades de realización de este tipo las conoce en sí el biólogo molecular.

35 A partir de esto se explica también la forma de realización preferente, según la cual en una célula de este tipo el ácido nucleico mencionado es parte de un vector, en particular de un vector de acuerdo con la invención descrito anteriormente.

Por lo tanto, a esto se asocian las ventajas descritas anteriormente en la manipulación, el almacenamiento, la expresión etc. del ácido nucleico en cuestión.

40 Se prefiere entre estas células en cada caso una célula huésped, en caso de la cual se trata de una bacteria, en particular de una que secreta la variante de α -amilasa formada al medio circundante.

Por lo tanto las bacterias se caracterizan por tiempos de generación cortos y bajas exigencias con las condiciones de cultivo. Debido a ello pueden establecerse procedimientos económicos. Además se dispone en el caso de bacterias en la técnica de fermentación de una amplia experiencia. Para una producción especial pueden ser adecuadas las bacterias Gram negativas o Gram positivas por los más diversos motivos que van a determinarse experimentalmente en el caso individual tales como fuentes de nutrientes, tasa de formación de productos, tiempo necesario etc.

50 Una forma de realización adicionalmente ventajosa se refiere a que la mayor parte de α -amilasas industrialmente importantes se han hallado originariamente como enzimas que se secretan por los microorganismos en cuestión, en particular bacterias en el medio circundante. Por lo tanto *in vivo* se trata en la mayoría de los casos de enzimas de digestión. De manera correspondiente a esto es ventajoso cuando las enzimas de acuerdo con la invención producidas industrialmente se secretan así mismo en el medio circundante. Por lo tanto a partir de éste pueden procesarse sin interrupción celular y con ello de manera comparativamente fácil. Esto puede conseguirse por ejemplo debido a que los genes en cuestión se complementan por secuencias correspondientes (siempre que éstas no estén presentes en cualquier caso) que codifican para un péptido líder que induce a la célula en cuestión a disponerlas.

55 Una alternativa en el caso de bacterias Gram negativas consiste por ejemplo en abrir parcialmente la membrana exterior para la liberación de proteínas, tal como se ha descrito esto por ejemplo en la solicitud WO 01/81597 A1.

En una forma de realización preferida se trata de una bacteria Gram-negativa, en particular de una de los géneros *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* o *Xanthomonas*, en particular de cepas de *E. coli* K12, *E. coli* B o *Klebsiella planticola*, y muy especialmente se trata de derivados de las cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3), *E. coli* RV308, *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109, *E. coli* XL-1 o *Klebsiella planticola* (Rf).

- 5 Por lo tanto, estas especies y cepas están establecidas en el estado de la técnica para etapas de trabajo de biología molecular y procesos de producción biotecnológicos. Éstas se encuentran a disposición además por medio de colecciones de cepas generalmente accesibles tal como la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig (<http://www.dsmz.de>) o de fuentes comerciales. Éstas pueden optimizarse además en la interacción con componentes restantes que están a disposición así mismo en gran número, tal como por ejemplo vectores en relación a las condiciones de producción específicas.

En el caso de bacterias Gram negativas, tales como por ejemplo *E. coli*, se secretan una pluralidad de proteínas en el espacio periplasmático. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Tal como se ha mencionado, se conocen también procedimientos según los cuales también las bacterias Gram negativas descargan las proteínas expresadas.

- 15 En una forma de realización alternativa, no menos preferente se trata de una bacteria Gram positiva, en particular de una de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* o *Corynebacterium*, muy especialmente de las especies *Bacillus lentus*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. globigii* o *B. alcalophilus*, *Staphylococcus carnosus* o *Corynebacterium glutamicum*, y entre ellas a su vez de manera muy especialmente preferente se trata de un derivado de *B. licheniformis* DSM 13.

- 20 Por lo tanto, las bacterias Gram positivas tienen la diferencia básica en comparación con las Gram negativas de liberar proteínas secretadas de inmediato en el medio nutritivo que rodea las células, del que pueden purificarse directamente, si se desea esto, las proteínas de acuerdo con la invención expresadas. Además éstas son afines o idénticas con la mayoría de los organismos de origen para enzimas técnicamente importantes y forman en la mayor parte de los casos incluso enzimas comparables, de modo que disponen de un uso de codón similar y su aparato de síntesis de proteínas está orientado naturalmente de manera correspondiente. La *B. licheniformis* DSM que caracteriza una forma de realización muy especialmente preferente está ampliamente extendida así mismo en el estado de la técnica como cepa de producción biotecnológica.

Otra forma de realización de la presente invención la forman los procedimientos para la producción de una variante de α -amilasa descrita anteriormente.

- 30 Los procedimientos de acuerdo con la invención en el sentido estricto para aumentar la estabilidad de una α -amilasa frente a una multimerización mediada por interacciones electrostáticas se han descrito ya anteriormente. Éstos designan las etapas preferentemente de biología molecular para generar las variantes de este tipo generalmente al principio. Los procedimientos definidos en este punto, en un sentido más amplio así mismo de acuerdo con la invención son aquéllos que son necesarios técnicamente para preparar las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención en cantidades cuantitativas. Por tanto se consideran (a excepción de la síntesis química de enzimas más bien solo teóricamente relevante) procedimientos de producción preferentemente biotecnológicos de variantes de acuerdo con la invención. En éstos se introducen habitualmente cepas de microorganismos a las que, con aplicación de técnicas de biología molecular en sí conocidas, se les ha permitido producir variantes de α -amilasa que se han reconocido ventajosas de acuerdo con la invención en el transcurso de la presente invención.

- 40 El procedimiento expuesto anteriormente de acuerdo con la invención, que se basa en particular en una mutagénesis puede introducirse por consiguiente como sección de procedimiento caracterizadora en un procedimiento biotecnológico establecido para la producción de α -amilasas, es decir puede combinarse con uno de este tipo.

- 45 Como detección para la formación de una proteína en cuestión en una cepa usada para la producción sirve una detección enzimática de las respectivas actividades enzimáticas a través de reacciones de detección en sí conocidas para actividad α -amilasa. Como detección a nivel de biología molecular pueden sintetizarse las proteínas representadas en el presente protocolo de secuencias según procedimientos habituales y pueden formarse anticuerpos contra esto. Estas proteínas pueden detectarse entonces por ejemplo a través de correspondientes inmunotransferencia tipo Western. De manera especialmente preferente reaccionan estos anticuerpos ante aquellas zonas de superficie que se han modificado de acuerdo con la invención, puesto que se proporciona de esto una capacidad de distinción en comparación con las variantes no de acuerdo con la invención.

- El objetivo de este procedimiento consiste en alimentar las respectivas α -amilasas a sus respectivas aplicaciones. Para ello puede recurrirse a todas las etapas de procesamiento, de purificación y de confección establecidas en la biotecnología. A esto pertenece por ejemplo el procedimiento descrito en la solicitud WO 2004/067557 A1, que se basa en una cromatografía para el ennoblecimiento de disoluciones enzimáticas concentradas que pueden aplicarse por consiguiente también de manera eficaz en preparaciones de amilasa. En esto se basa la solicitud DE 10360841.9 no publicada previamente, según la cual las respectivas disoluciones obtenidas mediante, entre otras, una etapa de cromatografía pueden procesarse para obtener granulados de enzimas. Otros aspectos de

procedimiento que van a combinarse así mismo de manera ventajosa con la presente invención se deducen de las solicitudes DE 102004021384.4 y DE 102004019528 igualmente no publicadas anteriormente, según las cuales pueden aumentarse la estabilidad en almacenamiento y la resistencia a la abrasión de los granulados de este tipo mediante incorporación de glicerina o 1,2-propanodiol o mediante un revestimiento especial.

5 Estos procedimientos se mejoran de acuerdo con la invención, en particular en las etapas parciales en las que la preparación de enzimas se encuentra aún en forma líquida, debido a que la variante de α -amilasa de acuerdo con la invención contenida tiende menos a la agregación a través de interacciones electrostáticas y por consiguiente se produce una pérdida más baja de actividad total. Debido a ello pueden producirse por ejemplo granulados de α -amilasa que contienen una proporción más alta de sustancia activa.

10 Preferentemente, en el caso de los procedimientos de preparación se trata de procedimientos que tienen lugar usando un ácido nucleico de acuerdo con la invención designado anteriormente, preferentemente usando un vector de acuerdo con la invención designado anteriormente y de manera especialmente preferente usando una célula de acuerdo con la invención designada anteriormente.

15 Por lo tanto mediante los mencionados ácidos nucleicos, en particular los ácidos nucleicos concretos indicados en el protocolo de secuencias se pone a disposición la información genética correspondientemente preferente en forma que puede aprovecharse microbiológicamente, es decir para procedimientos de producción de ingeniería genética. Es preferente de manera creciente la facilitación en un vector que puede aprovecharse de manera especialmente eficaz por la célula huésped o por las propias células de este tipo. Los procedimientos de producción en cuestión los conoce en sí el experto.

20 Las formas de realización de la presente invención pueden ser, basándose en las correspondientes secuencias de ácido nucleico, también sistemas de expresión libre de célula, en caso de los que se entiende la biosíntesis de proteínas *in vitro*. Todos los elementos expuestos ya anteriormente pueden combinarse también para dar nuevos procedimientos para preparar proteínas de acuerdo con la invención. Es concebible a este respecto para cada proteína de acuerdo con la invención una pluralidad de posibilidades de combinación de etapas de procedimiento, de modo que deben determinarse experimentalmente procedimientos óptimos para cada caso individual concreto.

25 Además se prefieren aquellos procedimientos de este tipo en los que la secuencia de nucleótidos en un codón, preferentemente varios codones y de manera especialmente preferente todos los codones se ha adaptado al uso de codón de la cepa huésped, ya que la transferencia de uno de los genes mencionados en una especie menos afín puede usarse entonces de manera especialmente eficaz para la síntesis de la proteína en cuestión, cuando ésta está optimizada de manera correspondiente con respecto al uso de los codones.

30 Otro objeto propio de la invención lo representan agentes que contienen una variante de α -amilasa de acuerdo con la invención descrita anteriormente.

35 Con esto se considera cualquier agente en el que se aplica la α -amilasa en cuestión en cualquier forma, es decir se lleva a contacto hidrolítico deseado con su sustrato almidón o polisacárido similar a almidón o se prepara para ello. El contacto deseado tiene lugar por regla general en un medio acuoso, que está tamponado de manera conveniente en un valor de pH correspondiente y opcionalmente contiene otros factores favorecedores. A esto pertenecen por ejemplo otras enzimas, que transforman posteriormente los inmediatos productos de reacción, por ejemplo en cuanto a la fluidificación del almidón para la producción de alimentos o piensos o para una producción de etanol. Además a esto pertenecen compuestos de bajo peso molecular que se incluyen por ejemplo en oligosacáridos producidos tales como ciclodextrinas, o compuestos de bajo peso molecular que solubilizan posteriormente los productos de disociación o presentan una acción que favorece a todo el procedimiento, tales como por ejemplo tensioactivos en el contexto de una fórmula de agente de lavado. Puede tratarse también de agentes en los que debe inducirse la actividad amilolítica deseada solo con un gran retraso temporal, tal como por ejemplo en procedimientos de adhesión temporales, según los cuales la variante de α -amilasa se añade al adhesivo en cuestión ya antes de tiempo, sin embargo se activa realmente solo tras largo tiempo mediante aumento del contenido en agua. Esto se aplica por ejemplo también a agentes de lavado y de limpieza que deben activarse solo tras una fase del almacenamiento en el momento de la dilución en el baño de lavado frente al sustrato.

Una forma de realización de este objeto de la invención son agentes de este tipo, en los que se trata de un agente de lavado o de limpieza.

50 Las propiedades de acuerdo con la invención y los ingredientes importantes para agentes de lavado y de limpieza de este tipo se describen en detalle a continuación. En este punto tiene lugar en primer lugar un resumen de las formas de realización más importantes y por tanto especialmente preferentes de acuerdo con la invención de agentes de lavado y de limpieza de este tipo:

- 55 - un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención que contiene del 0,000001 por ciento en peso al 5 % en peso, en particular del 0,00001 % al 3 % en peso de la variante de α -amilasa;
- un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención que contiene adicionalmente otras enzimas, en particular enzimas hidrolíticas u oxidorreductasas, de manera especialmente preferente otras amilasas,

proteasas, lipasas, cutinasas, hemicelulasas, celulasas, β -glucanasas, oxidasas, peroxidadas, perhidrolasas y/o lacasas;

- un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención, en el que la variante de α -amilasa mediante uno de los otros constituyentes del agente se estabiliza y/o se aumenta en su contribución al poder de lavado o de limpieza del agente;
- un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención que en conjunto es sólido, preferentemente después de una etapa de compactación para al menos uno de los componentes contenidos, de manera especialmente preferente, que en conjunto está compactado;
- un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención que en conjunto es líquido, en forma de gel o pastoso, preferentemente con encapsulación para al menos uno de los componentes contenidos, de manera especialmente preferente con encapsulación de al menos una de las enzimas contenidas, de manera muy especialmente preferente con encapsulación de la variante de α -amilasa.

Otro campo de uso importantes para amilasas es aquél como componentes activos en agentes de lavado o de limpieza para la limpieza de materiales textiles o de superficies sólidas, tal como por ejemplo la vajilla, suelos o aparatos de trabajo. En estas aplicaciones sirve la actividad amilolítica para disolver hidrolíticamente impurezas que contienen hidratos de carbono y en particular aquéllas a base de almidón o desprenderlas de la base. A este respecto pueden aplicarse solos, en medios adecuados o también en agentes de lavado o de limpieza. Las condiciones que han de seleccionarse para ello, tales como por ejemplo temperatura, valor de pH, fuerza iónica, proporciones redox o influencias mecánicas, debían optimizarse para el respectivo problema de limpieza, o sea en relación al ensuciamiento y al material de soporte. Así, las temperaturas habituales para los agentes de lavado y de limpieza se encuentran en intervalos de 10 °C en agentes a mano por encima de 40 °C y 60 °C hasta 95 °C en caso de agentes a máquina o en aplicaciones técnicas. Dado que en las lavadoras y los lavavajillas modernos puede ajustarse la temperatura en la mayoría de los casos sin etapas, están incluidas también todas las etapas intermedias de la temperatura. Preferentemente se ajustan uno a otro los ingredientes de los agentes en cuestión. Las demás condiciones pueden diseñarse a través de las demás partes constituyentes, expuestas a continuación, de los agentes así mismo de manera muy específica con respecto al fin de limpieza en cuestión.

Los agentes de lavado y de limpieza de acuerdo con la invención preferentes se caracterizan porque en cualquiera de las condiciones que pueden definirse de esta manera se mejora el poder de lavado o de limpieza de este agente mediante adición de una variante de α -amilasa de acuerdo con la invención en comparación con la fórmula sin esta variante. Se prefieren sinergias con respecto al poder de limpieza.

Una variante de α -amilasa de acuerdo con la invención puede usarse tanto en agentes para grandes consumidores o usuarios técnicos como también en productos para el consumo privado, representando todas las formas de dosificación convenientes y/o establecidas en el estado de la técnica también formas de realización de la presente invención. Con los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención se consideran por consiguiente todos los tipos de agentes de limpieza concebibles, tanto concentrados, como también agentes que van a usarse de manera no diluida; para su uso a escala comercial, en la lavadora o en el lavado o la limpieza a mano. A esto pertenecen por ejemplo agentes de lavado para materiales textiles, alfombras o fibras naturales, para los que se usa según la presente invención la denominación agente de lavado. A esto pertenecen por ejemplo también agentes lavavajillas para máquinas lavavajillas o agentes lavavajillas a mano o agentes de limpieza para superficies duras tales como metal, vidrio, porcelana, cerámica, azulejos, piedra, superficies lacadas, plásticos, madera o cuero; para éstos se usa según la presente invención la denominación agente de limpieza. Cualquier tipo de agentes de lavado o de limpieza representa una forma de realización de la presente invención, siempre que ésta esté enriquecida de una amilasa de acuerdo con la invención.

Las formas de realización de la presente invención comprenden todas las formas de dosificación establecidas en el estado de la técnica y/o todas las formas de dosificación convenientes de los agentes de acuerdo con la invención. A esto pertenecen por ejemplo agentes sólidos, en forma de polvo, líquidos, en forma de gel o pastosos, opcionalmente también de varias fases, comprimidos o no comprimidos; además a esto pertenecen por ejemplo: materiales extruidos, productos granulados, comprimidos o bolsitas, envasados tanto en sacos grandes como también en porciones.

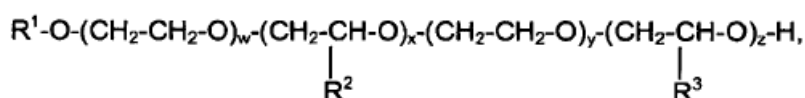
Las α -amilasas se combinan en agentes de acuerdo con la invención por ejemplo con ingredientes individuales o varios de los ingredientes siguientes: tensioactivos no iónicos, aniónicos y/o catiónicos, agentes de blanqueo, activadores de blanqueo, catalizadores de blanqueo, sustancias soporte y/o co-sustancias soporte, disolventes, espesantes, agentes secuestrantes, electrolitos, blanqueadores ópticos, inhibidores del agrisado, inhibidores de la corrosión, en particular agentes protectores de plata, principios activos de liberación de suciedad, inhibidores de la transferencia de color, inhibidores de formación de espuma, sustancias abrasivas, colorantes, sustancias aromáticas, principios activos antimicrobianos, agente protectores UV, enzimas tales como por ejemplo proteasas, (opcionalmente otras) amilasas, lipasas, celulasas, hemicelulasas u oxidasas, estabilizadores, en particular estabilizadores de enzima, y otros componentes que se conocen por el estado de la técnica.

Como tensioactivos no iónicos se usan preferentemente alcoholes alcoxilados, ventajosamente etoxilados, en particular primarios con preferentemente de 8 a 18 átomos de C y en promedio de 1 a 12 mol de óxido de etileno (OE) por mol de alcohol, en los que el resto alcohol puede ser lineal o preferentemente ramificado con metilo en la

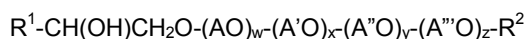
posición 2 o puede contener restos lineales y ramificados con metilo en mezcla, tal como se encuentran habitualmente en restos oxoalcohol. En particular se prefieren, sin embargo, etoxilatos de alcohol con restos lineales de alcoholes de origen natural con 12 a 18 átomos de C, por ejemplo de alcohol de coco, alcohol de palma, alcohol graso de sebo o alcohol oleílico, y en promedio de 2 a 8 OE por mol de alcohol. A los alcoholes etoxilados preferentes pertenecen por ejemplo alcoholes C₁₂₋₁₄ con 3 OE o 4 OE, alcohol C₉₋₁₁ con 7 OE, alcoholes C₁₃₋₁₅ con 3 OE, 5 OE, 7 OE u 8 OE, alcoholes C₁₂₋₁₈ con 3 OE, 5 OE o 7 OE y mezclas de éstos, tales como mezclas de alcohol C₁₂₋₁₄ con 3 OE y alcohol C₁₂₋₁₈ con 5 OE. Los grados de etoxilación indicados representan valores promedio estadísticos que para un producto especial puede ser un número entero o un número quebrado. Los etoxilatos de alcohol preferentes presentan una distribución de homólogos reducida (*narrow range ethoxylates*, NRE). De manera adicional a estos tensioactivos no iónicos pueden usarse también alcoholes grasos con más de 12 OE. Los ejemplos de ello son alcohol graso de sebo con 14 OE, 25 OE, 30 OE o 40 OE.

Otra clase de tensioactivos no iónicos usados preferentemente que se usan o bien como único tensioactivo no iónico o en combinación con otros tensioactivos no iónicos son ésteres alquílicos de ácidos grasos alcoxilados, preferentemente etoxilados o etoxilados y propoxilados, preferentemente con 1 a 4 átomos de carbono en la cadena de alquilo, en particular ésteres metílicos de ácidos grasos.

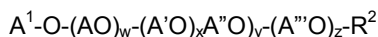
De la solicitud DE 102004020430.6 no publicada previamente se deducen agentes de limpieza, en particular agentes lavavajillas a máquina, que contienen (a) uno o varios tensioactivos no iónicos con la siguiente fórmula general:



en la que R¹ representa un resto alquilo C₆₋₂₄ o alqueniilo, los grupos R² y R³ en cada caso representan determinados restos de hidrocarburo y los índices w, x, y, z en cada caso representan números enteros hasta 6, o un sistema tensioactivo de al menos un tensioactivo no iónico F de fórmula general:



y al menos un tensioactivo no iónico G de fórmula general:



en las que R¹ representa un resto alquilo C₆₋₂₄ o alqueniilo, R² representa un resto hidrocarburo con 2 a 26 átomos de carbono, A, A', A'' y A''' en cada caso representan determinados restos de hidrocarburo y w, x, y y z en cada caso representan valores hasta 25, presentando este sistema tensioactivo los tensioactivos F y G en una proporción en peso entre 1:4 y 100:1 y como componente (b) una variante de α-amilasa especial.

Estos tensioactivos pueden combinarse en particular en agentes lavavajillas a máquina también con α-amilasas, que corresponden a la presente invención, en particular cuando éstas presentan además de las sustituciones de acuerdo con la invención aquéllas que pueden deducirse de una o varias de las solicitudes WO 96/23873 A1, WO 00/60060 A2 y WO 01/66712 A2. Esto se aplica en particular para el caso de que el producto comercial que se encuentra en estas solicitudes Stainzyme[®] de la empresa Novozymes se mejore en otras posiciones y se dote adicionalmente de al menos una sustitución de acuerdo con la invención. Por lo tanto en principio debe partirse de una acción aditiva de las distintas modificaciones.

Otra clase de tensioactivos no iónicos que pueden usarse ventajosamente son los alquilpoliglicósidos (APG). Los alquilpoliglicósidos que pueden usarse cumplen la fórmula general RO(G)_z, en la que R significa un resto alifático de cadena lineal o ramificado, en particular ramificado con metilo en la posición 2, saturado o insaturado con 8 a 22, preferentemente de 12 a 18 átomos de C y G es el símbolo que representa una unidad de glicósido con 5 o 6 átomos de C, preferentemente representa glucosa. El grado de glicosilación z se encuentra a este respecto entre 1,0 y 4,0, preferentemente entre 1,0 y 2,0 y en particular entre 1,1 y 1,4. Preferentemente se usan alquilpoliglucósidos lineales, o sea alquilpoliglicósidos en los que el resto poliglicósido es un resto de glucosa y el resto alquilo es un resto n-alquilo.

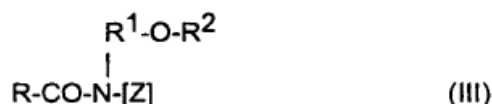
También pueden ser adecuados tensioactivos no iónicos del tipo de los óxidos de amina, por ejemplo óxido de N-coco-alquil-N,N-dimetilamina y óxido de N-sebo-alquil-N,N-dihidroxietilamina, y de las alcanolamidas de ácidos grasos. La proporción de estos tensioactivos no iónicos se encuentra preferentemente en no más de la de los alcoholes grasos etoxilados, en particular en no más de la mitad de la misma.

Otros tensioactivos adecuados son amidas de ácidos polihidrograsos de fórmula (II),



5 en la que RCO representa un resto acilo alifático con 6 a 22 átomos de carbono, R¹ representa hidrógeno, un resto alquilo o hidroxialquilo con 1 a 4 átomos de carbono y [Z] representa un resto polihidroxialquilo lineal o ramificado con 3 a 10 átomos de carbono y de 3 a 10 grupos hidroxilo. En el caso de las amidas de ácidos polihidroxisgrasos se trata de sustancias conocidas que pueden obtenerse habitualmente mediante aminación reductora de un azúcar reductor con amoníaco, una alquilamina o una alcanolamina y posterior acilación con un ácido graso, un éster alquílico de ácido graso o un cloruro de ácido graso.

Al grupo de las amidas de ácidos polihidroxisgrasos pertenecen también compuestos de fórmula (III),



10 en la que R representa un resto alquilo o alqueno lineal o ramificado con 7 a 12 átomos de carbono, R¹ representa un resto alquilo lineal, ramificado o cíclico o un resto arilo con 2 a 8 átomos de carbono y R² representa un resto alquilo lineal, ramificado o cíclico o un resto arilo o un resto oxi-alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, prefiriéndose restos alquilo C₁₋₄ o restos fenilo y [Z] representa un resto polihidroxialquilo lineal, cuya cadena de alquilo está sustituida con al menos dos grupos hidroxilo, o derivados alcoxilados, preferentemente etoxilados o propoxilados de estos restos.

[Z] se obtiene preferentemente mediante aminación reductora de un azúcar reductor, por ejemplo glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, galactosa, manosa o xilosa. Los compuestos sustituidos con N-alcoxilo o N-ariloxilo pueden convertirse en las deseadas amidas de ácidos polihidroxisgrasos, por ejemplo, mediante reacción con ésteres metílicos de ácidos grasos en presencia de un alcóxido como catalizador.

20 Como tensioactivos aniónicos se usan por ejemplo aquéllos del tipo de los sulfonatos y sulfatos. Como tensioactivos del tipo sulfonato se tienen en consideración a este respecto preferentemente alquil(C₉₋₁₃)bencenosulfonatos, sulfonatos de olefina, es decir mezclas de alquenosulfonatos e hidroxialcanosulfonatos así como disulfonatos, tal como se obtienen por ejemplo a partir de monoolefinas C₁₂₋₁₈ con doble enlace terminal o interno mediante sulfonación con trióxido de azufre gaseoso y posterior hidrólisis alcalina o ácida de los productos de sulfonación. Son adecuados también los alcanosulfonatos que se obtienen a partir de alcanos C₁₂₋₁₈ por ejemplo mediante sulfocloración o sulfoxidación con posterior hidrólisis o neutralización. Igualmente son adecuados también los ésteres de ácidos α-sulfograsos (estersulfonatos), por ejemplo los ésteres metílicos α-sulfonados de los ácidos grasos de coco, de semilla de palma o de sebo hidrogenados.

30 Otros tensioactivos aniónicos adecuados son ésteres de glicerina de ácidos grasos sulfatados. Por ésteres de glicerina de ácidos grasos ha de entenderse los monoésteres, diésteres y triésteres así como sus mezclas, tal como se obtienen en la preparación mediante esterificación de una monoglicerina con 1 a 3 mol de ácido graso o en la transesterificación de triglicéridos con 0,3 a 2 mol de glicerina. Los ésteres de glicerina de ácidos grasos sulfatados preferentes son a este respecto los productos de sulfatación de ácidos grasos saturados con 6 a 22 átomos de carbono, por ejemplo del ácido caprónico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico o ácido behénico.

40 Como sulfatos de alqu(en)ilo se prefieren las sales alcalinas y en particular las sales de sodio de los semiésteres de ácido sulfúrico de los alcoholes grasos C_{12-C18}, por ejemplo de alcohol graso de coco, alcohol graso de sebo, alcohol laurílico, mirístico, cetílico o estearílico o de los oxoalcoholes C_{10-C20} y aquellos semiésteres de alcoholes secundarios de estas longitudes de cadena. Además se prefieren sulfatos de alqu(en)ilo de la longitud de cadena mencionada que contienen un resto alquilo de cadena lineal sintético, preparado en base petroquímica, que tienen un comportamiento de degradación análogo a los compuestos adecuados a base de materias primas de la química de grasas. Debido a intereses técnicos de lavado se prefieren los sulfatos de alquilo C_{12-C16} y los sulfatos de alquilo C_{12-C15} así como los sulfatos de alquilo C_{14-C15}. También son tensioactivos aniónicos adecuados los 2,3-alquilsulfatos.

45 También son adecuados los monoésteres de ácido sulfúrico de los alcoholes C₇₋₂₁ de cadena lineal o ramificados etoxilados con 1 a 6 mol de óxido de etileno, tales como alcoholes C₉₋₁₁ ramificado con 2-metilo con en promedio 3,5 mol de óxido de etileno (OE) o alcoholes grasos C₁₂₋₁₈ con 1 a 4 OE. Éstos se usan en agentes de limpieza, debido a su alto comportamiento de formación de espuma, solo en cantidades relativamente bajas, por ejemplo en cantidades de hasta el 5 % en peso, habitualmente del 1 % al 5 % en peso.

50 Otros tensioactivos aniónicos adecuados son también las sales del ácido alquilsulfosuccínico que se designan también como sulfosuccinatos o como ésteres de ácido sulfosuccínico y representan los monoésteres y/o diésteres

del ácido sulfosuccínico con alcoholes, preferentemente alcoholes grasos y en particular alcoholes grasos etoxilados. Los sulfosuccinatos preferentes contienen restos alcohol graso C_{8-18} o mezclas de éstos. Los sulfosuccinatos en particular preferentes contienen un resto alcohol graso que se deriva de alcoholes grasos etoxilados, que representan tensioactivos no iónicos considerados a su vez (véase abajo la descripción). A este respecto se prefieren especialmente a su vez sulfosuccinatos cuyos restos alcohol graso se deriven de alcoholes grasos etoxilados con distribución de homólogos reducida. Igualmente es también posible usar ácido alqu(en)ilsuccínico con preferentemente 8 a 18 átomos de carbono en la cadena alqu(en)ilo o sus sales.

Como otros tensioactivos aniónicos se tienen en consideración en particular jabones. Son adecuados jabones de ácidos grasos saturados, tales como las sales del ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido erúrico hidrogenado y ácido behénico así como en particular mezclas de jabones derivadas de ácidos grasos naturales, por ejemplo ácidos grasos de coco, de semilla de palma o de sebo.

Los tensioactivos aniónicos incluyendo los jabones pueden encontrarse en forma de sus sales de sodio, de potasio o de amonio y como sales solubles de bases orgánicas, tales como mono-, di- o trietanolamina. Preferentemente, los tensioactivos aniónicos se encuentran en forma de sus sales de sodio o de potasio, en particular en forma de las sales de sodio.

Los tensioactivos pueden estar contenidos en los agentes de limpieza o de lavado de acuerdo con la invención en total en una cantidad de preferentemente el 5 % en peso al 50 % en peso, en particular del 8 % en peso al 30 % en peso, con respecto al agente acabado.

Los agentes de acuerdo con la invención pueden contener agentes de blanqueo. Entre los compuestos que sirven como agentes de blanqueo, que proporcionan H_2O_2 en agua tienen especial importancia el percarbonato de sodio, el perborato de sodio tetrahidratado y el perborato de sodio monohidratado. Otros agentes de blanqueo útiles son por ejemplo peroxopirofosfatos, citratos perhidratados así como sales perácidas que proporcionan H_2O_2 o perácidos, tales como persulfatos o ácido persulfúrico. Es útil también el peroxohidrato de urea percarbamida, que puede describirse mediante la fórmula $H_2N-CO-NH_2 \cdot H_2O_2$. En particular con el uso de los agentes para la limpieza de superficies duras, por ejemplo en lavavajillas a máquina, pueden contener éstos en caso deseado también agentes de blanqueo del grupo de los agentes de blanqueo orgánicos, aunque su uso es posible en principio también en agentes para el lavado de materiales textiles. Los agentes de blanqueo orgánicos típicos son los peróxidos de diacilo, tales como por ejemplo peróxido de dibenzoilo. Otros agentes de blanqueo orgánicos típicos son los peroxiácidos, mencionándose como ejemplos especialmente los alquilperoxiácidos y los arilperoxiácidos. Representantes preferentes son el ácido peroxibenzoico y sus derivados sustituidos en el anillo, tales como ácidos alquilperoxibenzoico, sin embargo también pueden usarse ácido peroxi- α -naftoico y monoperftalato de magnesio, los peroxiácidos alifáticos o alifáticos sustituidos, tales como ácido peroxiláurico, ácido peroxiesteárico, ácido ϵ -ftalimidoperoxycaprónico (ácido ftalimidoperoxihexanoico, PAP), ácido o-carboxibenzamidoperoxycaprónico, ácido N-nonenilamidoperoxycaprónico y N-nonenilamidopersuccinatos, y ácidos peroxidicarboxílicos alifáticos y aralifáticos, tales como ácido 1,12-diperoxycarboxílico, ácido 1,9-diperoxiazelaico, ácido diperoxisebácico, ácido diperoxibrasílico, los ácidos diperoxifáticos, ácido 2-decildiperoxibutano-1,4-dioico, ácido N,N-tereftaloildi(6-aminopercaprónico).

El contenido de los agentes en agentes de blanqueo puede ascender a del 1 % al 40 % en peso y en particular del 10 % al 20 % en peso, usándose ventajosamente perborato monohidratado o percarbonato. Un uso sinérgico de amilasa con percarbonato o de amilasa con ácido percarboxílico se da a conocer con las solicitudes WO 99/63036, o WO 99/63037.

Para conseguir durante el lavado a temperaturas de 60 °C y por debajo, y en particular en el pretratamiento de la colada, una acción de blanqueo mejorada pueden contener los agentes también activadores de blanqueo. Como activadores de blanqueo pueden usarse compuestos que dan como resultado ácidos peroxocarboxílicos alifáticos en condiciones de perhidrólisis con preferentemente 1 a 10 átomos de C, en particular de 2 a 4 átomos de C, y/o ácido perbenzoico eventualmente sustituido. Son adecuadas sustancias que llevan grupos O-acilo y/o N-acilo del número de átomos de C mencionado y/o grupos benzoilo eventualmente sustituidos. Se prefieren alquilendiaminas aciladas varias veces, en particular tetraacetilendiamina (TAED), derivados de triazina acilados, en particular 1,5-diacetil-2,4-dioxohexahidro-1,3,5-triazina (DADHT), glicolurilos acilados, en particular 1,3,4,6-tetraacetilglicolurilo (TAGU), N-acilimididas, en particular N-nonanoilsuccinimida (NOSI), fenolsulfonatos acilados, en particular n-nonanoil- o isononanoiloxibenzenosulfonato (n- o iso-NOBS), ácidos hidroxycarboxílicos acilados, tales como trietil-O-acetilcitrato (TEOC), anhídridos de ácidos carboxílicos, en particular anhídrido de ácido ftálico, anhídrido de ácido isoatoico y/o anhídrido de ácido succínico, amidas de ácidos carboxílicos, tales como N-metilacetamida, glicólido, alcoholes polihidroxilados acilados, en particular triacetina, diacetato de etilenglicol, acetato de isopropenilo, 2,5-diacetoxi-2,5-dihidrofurano y los ésteres enólicos conocidos por las solicitudes de patente alemanas DE 196 16 693 y DE 196 16 767 así como sorbitol y manitol acetilado o sus mezclas descritas en la solicitud de patente europea EP 0 525 239 (SORMAN), derivados de azúcar acilados, en particular pentaacetilglucosa (PAG), pentaacetilfructosa, tetraacetilxilosa y octaacetilactosa así como glucamina o gluconolactona acetilada, opcionalmente N-alquilada, triazol o derivados de triazol y/o caprolactamas en forma de partículas y/o derivados de caprolactama, preferentemente lactamas N-aciladas, por ejemplo N-benzoilcaprolactama y N-acetilcaprolactama. Se usan igualmente de manera preferente acilacetales y acilactamas sustituidos de manera hidrófila. También pueden usarse combinaciones de activadores de blanqueo convencionales. Igualmente pueden usarse derivados de nitrilo

tales como cianopiridinas, nitrilquats, por ejemplo N-alquilamonio-acetonitrilos, y/o derivados de cianamida. Los activadores de blanqueo preferentes son 4-(octanoiloxi)-bencenosulfonato de sodio, n-nonanoil- o isononanoiloxibencenosulfonato (n- o iso-NOBS), undecenoiloxibencenosulfonato (UDOBS), dodecanoiloxibencenosulfonato de sodio (DOBS), ácido decanoiloxibenzoico (DOBA, OBC 10) y/o dodecanoiloxibencenosulfonato (OBS 12), así como N-metilmorfolinio-acetonitrilo (MMA). Los activadores de blanqueo de este tipo pueden estar contenidos en el intervalo de cantidades habitual del 0,01 % al 20 % en peso, preferentemente en cantidades del 0,1 % al 15 % en peso, en particular del 1 % en peso al 10 % en peso, con respecto a la composición total.

De manera adicional a los activadores de blanqueo convencionales o en su lugar pueden estar contenidos también los denominados catalizadores de blanqueo. En el caso de estas sustancias se trata de sales de metales de transición o complejos de metales de transición que refuerzan el blanqueo tales como por ejemplo complejos de carbonilo o complejos de sales de Mn, Fe, Co, Ru o Mo. También son adecuados como catalizadores de blanqueo complejos de Mn, Fe, Co, Ru, Mo, Ti, V y Cu con ligandos tipo trípode que contienen N así como complejos de amino de Co, Fe, Cu y Ru. De acuerdo con el documento WO 99/63038 pueden desarrollar una acción de activación del blanqueo también derivados de acetonitrilo y compuestos de complejos de metales de transición que activan el blanqueo de acuerdo con el documento WO 99/63041 en combinación con amilasas.

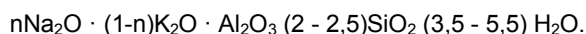
Los agentes de acuerdo con la invención contienen por regla general una o varias sustancias soporte, en particular zeolitas, silicatos, carbonatos, co-sustancias soporte orgánicas y (donde no se mencionen motivos ecológicos contra su uso) también los fosfatos. Éstos últimos son en particular ayudantes que van a usarse preferentemente en agentes de limpieza para el lavado de vajillas a máquina.

Pueden mencionarse en este caso silicatos de sodio estratificados cristalinos de fórmula general $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$, en la que M significa sodio o hidrógeno, x es un número de 1,6 a 4, preferentemente de 1,9 a 4,0 e y es un número de 0 a 20 y valores preferentes para x son 2, 3 o 4. Los silicatos estratificados cristalinos preferentes de la fórmula indicada son aquéllos en los que M representa sodio y x adopta los valores 2 o 3. En particular se prefieren tanto β -disilicatos de sodio como δ -disilicatos de sodio $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$. En el comercio se encuentran compuestos de este tipo por ejemplo con la denominación SKS[®] (empresa Clariant). Así se trata en el caso de SKS-6[®] predominantemente de un δ -disilicato de sodio con la fórmula $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, en el caso de SKS-7[®] se trata predominantemente del β -disilicato de sodio. Mediante la reacción con ácidos (por ejemplo ácido cítrico o ácido carbónico) se produce a partir del δ -disilicato de sodio kanemita $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, en el comercio con las denominaciones SKS-9[®] o SKS-10[®] (empresa Clariant). Puede ser ventajoso también usar modificaciones químicas de estos silicatos estratificados. Así puede verse influida de manera adecuada, por ejemplo, la alcalinidad de los silicatos estratificados. Los silicatos estratificados impurificados con fosfato o con carbonato presentan en comparación con el δ -disilicato de sodio morfologías cristalinas modificadas, se disuelven más rápidamente y muestran en comparación con el δ -disilicato de sodio una elevada capacidad de unión a calcio. Pueden mencionarse especialmente los silicatos estratificados de fórmula total general $x \text{Na}_2\text{O} \cdot y \text{SiO}_2 \cdot z \text{P}_2\text{O}_5$, en la que la proporción de x con respecto a y corresponde a un número de 0,35 a 0,6, la proporción de x con respecto a z corresponde a un número de 1,75 a 1200 y la proporción de y con respecto a z corresponde a un número de 4 a 2800. La solubilidad de los silicatos estratificados puede aumentarse también, usándose especialmente silicatos estratificados finamente divididos. También pueden usarse compuestos de los silicatos estratificados cristalinos con otras sustancias constituyentes. A este respecto pueden mencionarse en particular compuestos con derivados de celulosa que presentan ventajas en la acción de disgregación y se usan en particular en comprimidos de agentes de lavado, así como compuestos con policarboxilatos, por ejemplo ácido cítrico, o policarboxilatos poliméricos, por ejemplo copolímeros del ácido acrílico.

Pueden usarse también silicatos de sodio amorfos con un módulo $\text{Na}_2\text{O} : \text{SiO}_2$ de 1:2 a 1:3,3, preferentemente de 1:2 a 1:2,8 y en particular de 1:2 a 1:2,6, que son de disolución retardada y que presentan propiedades de lavado secundarias. El retardo de la disolución con respecto a los silicatos de sodio amorfos convencionales puede haberse provocado a este respecto de distintas maneras, por ejemplo mediante tratamiento de superficie, combinación, compactación / consolidación o mediante secado excesivo. En el contexto de la presente invención se entiende por el término "amorfo" también "amorfo a los rayos X". Es decir que los silicatos en experimentos de difracción de rayos X no proporcionan reflejos de rayos X intensos, tal como son típicos de las sustancias cristalinas, sino, en todo caso, uno o varios máximos de la radiación de rayos X dispersada, que presentan una amplitud de varias unidades de grados del ángulo de difracción. Sin embargo, puede llevar incluso perfectamente a propiedades de soporte especialmente adecuadas cuando las partículas de silicato, en experimentos de difracción de electrones, proporcionan máximos de difracción difuminados o incluso intensos. Esto ha de interpretarse de modo que los productos presenten zonas microcristalinas del tamaño de 10 a algunos cientos de nm, prefiriéndose valores de hasta como máximo 50 nm y en particular de hasta como máximo 20 nm. En particular se prefieren silicatos amorfos consolidados/compactados, silicatos amorfos combinados y silicatos amorfos a los rayos X secados excesivamente.

Una zeolita finamente cristalina, sintética y que contiene agua unida que dado el caso se puede usar es preferentemente zeolita A y/o P. Como zeolita P se prefiere especialmente zeolita MAP[®] (producto comercial de la empresa Crosfield). Sin embargo, son adecuadas también zeolita X así como mezclas de A, X y/o P. Está disponible en el mercado y en el contexto de la presente invención preferentemente puede usarse por ejemplo también un

producto co-cristalizado de zeolita X y zeolita A (aproximadamente el 80 % en peso de zeolita X), que se comercializa por la empresa CONDEA Augusta S.p.A. con el nombre comercial VEGOBOND AX® y que puede describirse mediante la fórmula



- 5 Las zeolitas adecuadas presentan un tamaño de partícula medio inferior a 10 µm (distribución de volumen; procedimiento de medición: contador Coulter) y contienen preferentemente del 18 al 22 % en peso, en particular del 20 al 22 % en peso de agua unida.

10 Naturalmente es también posible un uso de los fosfatos conocidos en general como sustancias de soporte, siempre que un uso de este tipo no tenga que evitarse por motivos ecológicos. Entre los múltiples fosfatos que están disponibles en el mercado, los fosfatos de metal alcalino tienen, con especial preferencia de trifosfato de pentasodio o e pentapotasio (tripolifosfato de sodio o de potasio), la mayor importancia en la industria de los agentes de lavado y de limpieza.

15 Fosfatos de metal alcalino es a este respecto la denominación resumida para sales de metal alcalino (en particular de sodio y de potasio) de los distintos ácidos fosfóricos, en las que puede diferenciarse ácidos metafosfóricos (HPO_3)_n y ácido ortofosfórico H_3PO_4 junto a representantes de mayor peso molecular. Los fosfatos añan a este respecto varias ventajas en sí: actúan como vehículos de alcalinos, impiden depósitos de cal sobre piezas de máquinas o incrustaciones de cal en tejidos y contribuyen además al poder de limpieza.

20 El dihidrogenofosfato de sodio, NaH_2PO_4 , existe como dihidrato (densidad 1,91 gcm⁻³, punto de fusión 60°) y como monohidrato (densidad 2,04 gcm⁻³). Ambas sales son polvos blancos muy fácilmente solubles en agua que pierden con el calentamiento el agua de constitución y que a 200 °C se convierten en el difosfato débilmente ácido (hidrogenodifosfato disódico, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), a mayor temperatura en trimetafosfato sódico ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) y sal de Maddrell (véase más adelante). El NaH_2PO_4 reacciona de forma ácida; se produce cuando se ajusta ácido fosfórico con hidróxido sódico a un valor de pH de 4,5 y se pulveriza el caldo. El dihidrogenofosfato de potasio (fosfato de potasio primario o monobásico, bifosfato de potasio, KDP), KH_2PO_4 , es una sal blanca con la densidad 2,33 gcm⁻³, tiene un punto de fusión a 253° [descomposición con formación de polifosfato de potasio (KPO_3)_x] y es fácilmente soluble en agua.

30 El hidrogenofosfato disódico (fosfato sódico secundario), Na_2HPO_4 , es una sal cristalina incolora muy fácilmente soluble en agua. Existe de forma anhidro y con 2 mol (densidad 2,066 gcm⁻³, pérdida de agua a 95°), 7 mol (densidad 1,68 gcm⁻³, punto de fusión 48° con pérdida de 5 H₂O) y 12 mol de agua (densidad 1,52 gcm⁻³, punto de fusión 35° con pérdida de 5 H₂O), se hace anhidro a 100° y con un mayor calentamiento se convierte en el difosfato $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. El hidrogenofosfato disódico se prepara mediante neutralización de ácido fosfórico con solución de carbonato sódico mediante el uso de fenolftaleína como indicador. El hidrogenofosfato dipotásico (fosfato de potasio secundario o dibásico), K_2HPO_4 , es una sal blanca amorfa que es muy fácilmente soluble en agua.

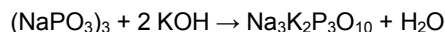
35 El fosfato trisódico, fosfato sódico terciario, Na_3PO_4 , son cristales incoloros que presentan como dodecahidrato una densidad de 1,62 gcm⁻³ y un punto de fusión de 73-76 °C (descomposición), como decahidrato (correspondiente al 19-20 % de P₂O₅) un punto de fusión de 100 °C y en forma anhidro (correspondiente al 39-40 % de P₂O₅), una densidad de 2,536 gcm⁻³. El fosfato trisódico es fácilmente soluble en agua con reacción alcalina y se prepara mediante evaporación de una solución a partir de exactamente 1 mol de fosfato disódico y 1 mol de NaOH. El fosfato tripotásico (fosfato de potasio terciario o tribásico), K_3PO_4 , es un polvo granular fluido blanco con la densidad 2,56 gcm⁻³, tiene un punto de fusión de 1340° y es fácilmente soluble en agua con reacción alcalina. Se produce, por ejemplo, con el calentamiento de escoria de Thomas con carbón y sulfato de potasio. A pesar del mayor precio, en la industria de los agentes de limpieza se prefiere a menudo los fosfatos de potasio más fácilmente solubles, por tanto, de alta eficacia, frente a los compuestos de sodio correspondientes.

45 El difosfato tetrasódico (pirofosfato sódico), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existe en forma anhidro (densidad 2,534 gcm⁻³, punto de fusión 988°, también indicado 880°) y como decahidrato (densidad 1,815-1,836 gcm⁻³, punto de fusión 94° con pérdida de agua). Ambas sustancias son cristales incoloros solubles en agua con reacción alcalina. El $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ se produce con el calentamiento de fosfato disódico a >200 °C o al hacer reaccionar ácido fosfórico con carbonato sódico en relación estequiométrica y deshidratando la solución mediante pulverización. El decahidrato forma complejos con sales de metales pesados y formadores de dureza y, por tanto, reduce la dureza del agua. El difosfato de potasio (pirofosfato de potasio), $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existe en forma del trihidrato y representa un polvo higroscópico incoloro con la densidad 2,33 gcm⁻³, que es soluble en agua, ascendiendo el valor del pH de la solución al 1 % a 25° a 10,4.

50 Mediante condensación del NaH_2PO_4 o del KH_2PO_4 se generan fosfatos de sodio y de potasio de mayor peso molecular, en los que pueden diferenciarse representantes cíclicos, los metafosfatos de sodio o de potasio y tipos en forma de cadena, los polifosfatos de sodio o potasio. En particular para estos últimos se usan múltiples denominaciones: fosfatos fundidos o calcinados, sal de Graham, sal de Kurrol y sal de Maddrell. Todos los fosfatos de sodio y de potasio superiores se denominan en conjunto fosfatos condensados.

El trifosfato de pentasodio técnicamente importante, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (tripolifosfato de sodio), es una sal anhidro o que cristaliza con 6 H₂O, no higroscópica, blanca, soluble en agua de fórmula general $\text{NaO}[\text{P}(\text{O})(\text{ONa})\text{O}]_n\text{Na}$ con n=3.

En 100 g de agua se disuelven a temperatura ambiente aproximadamente 17 g, a 60° aproximadamente 20 g, a 100° alrededor de 32 g de sal sin agua de constitución; después de calentamiento durante dos horas de la solución a 100° se produce mediante hidrólisis aproximadamente el 8 % de ortofosfato y el 15 % de difosfato. En la preparación de trifosfato pentasódico se hace reaccionar ácido fosfórico con solución de carbonato sódico o hidróxido sódico en relación estequiométrica y se deshidrata la solución mediante pulverización. De forma similar a la sal de Graham y difosfato sódico, el trifosfato pentasódico disuelve muchos compuestos de metal insolubles (también jabones de cal, etc.). El trifosfato de pentapotasio, $K_5P_3O_{10}$ (tripolifosfato de potasio), se encuentra por ejemplo en forma de una solución al 50 % en peso (> 23% de P_2O_5 , 25% de K_2O) en el mercado. Los polifosfatos de potasio se usan ampliamente en la industria de los agentes de lavado y de limpieza. Existen además también tripolifosfatos de sodio y potasio que pueden usarse asimismo en el contexto de la presente invención. Estos se generan por ejemplo cuando se hidroliza trimetafosfato de sodio con KOH:



Estos pueden usarse de acuerdo con la invención al igual que tripolifosfato de sodio, tripolifosfato de potasio o mezclas de ambos; también pueden usarse de acuerdo con la invención mezclas de tripolifosfato de sodio y tripolifosfato de sodio-potasio o mezclas de tripolifosfato de potasio y tripolifosfato de sodio-potasio o mezclas de tripolifosfato de sodio y tripolifosfato de potasio y tripolifosfato de sodio-potasio.

Como cosoportes orgánicos se pueden usar en los agentes de lavado y limpieza de acuerdo con la invención en particular policarboxilatos o ácidos policarboxílicos, policarboxilatos poliméricos, ácido poliaspártico, poliacetales, dextrinas dado el caso oxidadas, otros cosoportes orgánicos (véase a continuación) así como fosfonatos. Estas clases de sustancias se describen a continuación.

Sustancias ayudantes orgánicas que pueden usarse son, por ejemplo, los ácidos policarboxílicos que pueden usarse en forma de sus sales de sodio, entendiéndose por ácidos policarboxílicos aquellos ácidos carboxílicos que portan más de una función ácido. Por ejemplo, estos son ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácidos de azúcar, ácidos aminocarboxílicos, ácido nitrilotriacético (NTA), siempre que no deba evitarse un uso de este tipo por motivos ecológicos, así como mezclas de los mismos. Sales preferidas son las sales de los ácidos policarboxílicos tales como ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido tartárico, ácidos de azúcar y mezclas de los mismos.

También pueden usarse los ácidos en sí. Tienen, además de su efecto de soporte, típicamente también la propiedad de un componente de acidificación y sirven, por lo tanto, también para el ajuste de un valor de pH menor y más suave de agentes de lavado o de limpieza, siempre que no se desee el valor de pH que resulta debido a la mezcla de los restantes componentes. En particular han de mencionarse en este sentido ácidos compatibles con el sistema y el medio ambiente, tales como ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido glucónico y mezclas discrecionales de los mismos. Pero también ácidos minerales, en particular ácido sulfúrico o bases, en particular hidróxidos de amonio o de metal alcalino pueden servir de reguladores del pH. Tales reguladores están contenidos en los agentes de acuerdo con la invención en cantidades de, preferentemente, no más del 20 % en peso, en particular del 1,2 % en peso al 17 % en peso.

Como soportes son adecuados además policarboxilatos poliméricos, estos son, por ejemplo, las sales de metal alcalino del poli(ácido acrílico) o del poli(ácido metacrílico), por ejemplo aquellos con un peso molecular relativo de 500 a 70 000 g/mol.

En el caso de los pesos moleculares indicados para policarboxilatos poliméricos se trata, en el sentido del presente documento, de pesos moleculares promedio en peso M_w de la respectiva forma de ácido, que se determinaron fundamentalmente por medio de cromatografía de permeación en gel (CPG), utilizándose un detector de UV. La medición tuvo lugar a este respecto frente a un patrón de poli(ácido acrílico) externo, que debido a su semejanza estructural con los polímeros sometidos a ensayo proporciona valores de peso molecular realistas. Estos datos se desvían claramente de los datos del peso molecular en los que se usan poli(ácidos estirenosulfónicos) como patrón. Los pesos moleculares medidos frente a poli(ácidos estirenosulfónicos) son, por norma general, claramente mayores que los pesos moleculares indicados en el presente documento.

Polímeros adecuados son en particular poliacrilatos que presentan preferentemente un peso molecular de 2 000 a 20 000 g/mol. Debido a su solubilidad superior, de este grupo pueden preferirse a su vez los poliacrilatos de cadena corta que presentan pesos moleculares de 2 000 a 10 000 g/mol y de manera especialmente preferente de 3 000 a 5 000 g/mol.

Son además adecuados policarboxilatos copoliméricos, en particular aquellos del ácido acrílico con ácido metacrílico y del ácido acrílico o ácido metacrílico con ácido maleico. Han resultado ser especialmente adecuados copolímeros del ácido acrílico con ácido maleico que contienen del 50 al 90 % en peso de ácido acrílico y del 50 al 10 % en peso de ácido maleico. Su peso molecular relativo, con respecto a ácidos libres, asciende en general a de 2 000 a 70 000 g/mol, preferentemente de 20 000 a 50 000 g/mol y en particular de 30 000 a 40 000 g/mol. Los policarboxilatos (co)poliméricos pueden usarse o bien como polvo o bien como solución acuosa. El contenido de los agentes en

policarboxilatos (co)poliméricos puede ascender a del 0,5 al 20 % en peso, en particular del 1 al 10 % en peso.

Para mejorar la solubilidad en agua, los polímeros pueden contener también ácidos alilsulfónicos, tales como por ejemplo ácido alilolibencenosulfónico y ácido metalilsulfónico como monómero.

5 En particular se prefieren también polímeros biológicamente degradables de más de dos unidades monoméricas distintas, por ejemplo aquellos que como monómeros contienen sales del ácido acrílico y del ácido maleico así como alcohol vinílico o derivados de alcohol vinílico o que como monómeros contienen sales del ácido acrílico y del ácido 2-alquilalilsulfónico así como derivados de azúcar.

Copolímeros preferidos adicionales son aquellos que como monómeros presentan preferentemente acroleína y ácido acrílico/sales de ácido acrílico o acroleína y acetato de vinilo.

10 Asimismo han de mencionarse como sustancias de soporte preferidas adicionales ácidos aminocarboxílicos poliméricos, sus sales o sus sustancias precursoras. Se prefieren especialmente poli(ácidos aspárticos) o sus sales.

15 Otras sustancias de soporte adecuadas son poliacetales que pueden obtenerse mediante reacción de dialdehídos con ácidos poliolarboxílicos, que presentan de 5 a 7 átomos de C y al menos 3 grupos hidroxilo. Poliacetales preferidos se obtienen a partir de dialdehídos tales como glioxal, glutaraldehído, tereftalaldehído así como mezclas de los mismos y a partir de ácidos poliolarboxílicos tales como ácido glucónico y/o ácido glucoheptónico.

20 Otras sustancias de soporte orgánicas adecuadas son dextrinas, por ejemplo oligómeros o polímeros de hidratos de carbono, que pueden obtenerse mediante hidrólisis parcial de almidones. La hidrólisis puede llevarse a cabo de acuerdo con procedimientos habituales, por ejemplo catalizados con ácido o con enzimas. Preferentemente se trata de productos de hidrólisis con pesos moleculares medios en el intervalo de 400 a 500 000 g/mol. A este respecto se prefiere un polisacárido con un equivalente de dextrosa (DE) en el intervalo de 0,5 a 40, en particular de 2 a 30, siendo DE una medida habitual del efecto reductor de un polisacárido en comparación con dextrosa, que tiene un DE de 100. Son útiles tanto maltodextrina con un DE entre 3 y 20 como jarabe de glucosa anhidro con un DE entre 20 y 37 como también las denominadas dextrinas amarillas y dextrinas blancas con mayores pesos moleculares en el intervalo de 2 000 a 30 000 g/mol.

25 En el caso de los derivados oxidados de dextrinas de este tipo se trata de sus productos de reacción con agentes de oxidación, que pueden oxidar al menos una función alcohol del anillo de sacárido para dar la función ácido carboxílico. Los soportes orgánicos particularmente preferentes para agentes de acuerdo con la invención son almidones oxidados o sus derivados conocidos.

30 También son cosoportes adecuados adicionales oxidisuccinatos y otros derivados de disuccinatos, preferentemente disuccinato de etilendiamina. A este respecto se usa N,N'-disuccinato de etilendiamina (EDDS) preferentemente en forma de sus sales de sodio o de magnesio. Además se prefieren en este contexto también disuccinatos de glicerina y trisuccinatos de glicerina. Las cantidades de uso adecuadas se encuentran en formulaciones que contienen zeolitas y/o que contienen silicatos entre el 3 y el 15 % en peso.

35 Otros cosoportes orgánicos útiles son, por ejemplo, ácidos hidroxicarboxílicos acetilados o sus sales, que pueden encontrarse también dado el caso en forma de lactona y que contienen al menos 4 átomos de carbono y al menos un grupo hidroxilo así como, como máximo, dos grupos ácido.

40 Una clase de sustancias adicional con propiedades de cosoporte la representan los fosfonatos. A este respecto se trata en particular de fosfonatos de hidroxialcano o aminoalcano. Entre los fosfonatos de hidroxialcano es de particular importancia como cosoporte el 1,1-difosfonato de 1-hidroxietano (HEDP). Se usa preferentemente como sal de sodio, reaccionando la sal de disodio de forma neutra y la sal de tetrasodio de forma alcalina (pH 9). Como fosfonatos de aminoalcano se tienen en cuenta preferentemente fosfonato de etilendiaminotetrametileno (EDTMP), fosfonato de dietilentriaminopentametileno (DTPMP) así como sus homólogos superiores. Se usan preferentemente en forma de las sales de sodio que reaccionan de forma neutra, por ejemplo como sal de hexasodio del EDTMP o como sal de hepta- y octa-sodio del DTPMP. Como soporte se usa a este respecto de la clase de los fosfonatos preferentemente HEDP. Los fosfonatos de aminoalcano poseen además una marcada capacidad de unión a metales pesados. Por consiguiente, puede preferirse, en particular cuando los agentes contienen también lejía, usar fosfonatos de aminoalcano, en particular DTPMP, o mezclas de los fosfonatos mencionados.

Además pueden usarse todos los compuestos que pueden formar complejos con iones alcalinotérreos como cosoportes.

50 Las sustancias de soporte pueden estar contenidas en los agentes de acuerdo con la invención dado el caso en cantidades de hasta el 90 % en peso. Están contenidas preferentemente en cantidades de hasta el 75 % en peso. Los agentes de lavado de acuerdo con la invención presentan contenidos de soporte de en particular del 5 % en peso al 50 % en peso. En agentes de acuerdo con la invención para la limpieza de superficies duras, en particular para la limpieza a máquina de vajilla, el contenido de sustancias de soporte asciende en particular a del 5 % en peso al 88 % en peso, no empleándose en tales agentes preferentemente ningún material de soporte insoluble en agua.

55 En una forma de realización preferente de agentes de acuerdo con la invención para la limpieza en particular a

máquina de vajilla están contenidos del 20 % en peso al 40 % en peso de soportes orgánicos solubles en agua, en particular citrato de metal alcalino, del 5 % en peso al 15 % en peso de carbonato de metal alcalino y del 20 % en peso al 40 % en peso de disilicato de metal alcalino.

5 Los disolventes que se pueden emplear en las composiciones de líquidas a en forma de gel de los agentes de lavado y limpieza proceden, por ejemplo, del grupo de los alcoholes mono- o polihidroxicos, alcanolaminas o éteres de glicol, siempre que sean miscibles con agua en el intervalo de concentraciones indicado. Preferentemente, los disolventes se seleccionan de etanol, n- o i-propanol, butanoles, éter de metilo de etilenglicol, éter de etilo de etilenglicol, éter de propilo de etilenglicol, mono-n-butiléter de etilenglicol, éter de metilo de dietilenglicol, éter de etilo de dietilenglicol, éter de metilo, etilo o propilo de propilenglicol, monometil- o -etiléter de dipropilenglicol, monometil- o -etiléter de di-isopropilenglicol, metoxi-, etoxi- o butoxitriglicol, 1-butoxi-etoxi-2-propanol, 3-metil-3-metoxibutanol, éter de t-butilo de propilen-glicol así como mezclas de estos disolventes.

10 Los disolventes se pueden emplear en agentes de lavado y limpieza de líquidos a en forma de gel de acuerdo con la invención en cantidades entre el 0,1 y el 20 % en peso, pero preferentemente por debajo del 15 % en peso y en particular por debajo del 10 % en peso.

15 Para el ajuste de la viscosidad se pueden añadir a las composiciones de acuerdo con la invención uno o varios espesantes o sistemas de espesantes. Estas sustancias de alto peso molecular, que se denominan también agentes de hinchado (hinchamiento), la mayoría de las veces absorben los líquidos y a este respecto se hinchan para convertirse, finalmente, en soluciones viscosas verdaderas o coloidales.

20 Son espesantes adecuados compuestos inorgánicos u orgánicos poliméricos. A los espesantes inorgánicos pertenecen, por ejemplo, poliácidos silícicos, minerales de arcilla tales como montmorillonita, zeolita, ácidos silícicos y bentonita. Los espesantes orgánicos proceden de los grupos de los polímeros naturales, de los polímeros naturales modificados y de los polímeros completamente sintéticos. Tales polímeros procedentes de la naturaleza son, por ejemplo, agar-agar, carragenano, tragacanto, goma arábiga, alginatos, pectinas, poliosas, harina de guar, harina de semilla de algarrobo, almidón, dextrinas, gelatina y caseína. Las sustancias naturales modificadas que se usan como espesante proceden sobre todo del grupo de los almidones y las celulosas modificados. En este caso se mencionan, a modo de ejemplo, carboximetilcelulosa y otros éteres de celulosa, hidroxietil- y -propilcelulosa así como éter de flor de harina. Son espesantes completamente sintéticos polímeros tales como compuestos poliacrílicos y polimetacrílicos, polímeros de vinilo, poli(ácidos carboxílicos), poliéteres, poliminas, poliamidas y poliuretanos.

25 Los espesantes pueden estar contenidos en una cantidad de hasta el 5 % en peso, preferentemente del 0,05 al 2 % en peso y de forma particularmente preferente del 0,1 al 1,5 % en peso en relación con la composición terminada.

El agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención puede contener, dado el caso, como otros ingredientes habituales secuestrantes, electrolitos y otros coadyuvantes.

35 Los agentes de lavado de materiales textiles de acuerdo con la invención pueden contener como blanqueadores ópticos derivados del ácido diaminoestilbendisulfónico o sus sales de metal alcalino. Son adecuadas, por ejemplo, sales del ácido 4,4'-bis(2-anilino-4-morfolino-1,3,5-triazinil-6-amino)estilben-2,2'-disulfónico o compuestos estructurados del mismo modo que, en lugar del grupo morfolino, llevan un grupo dietanolamino, un grupo metilamino, un grupo anilino o un grupo 2-metoxietilamino. Además pueden estar presentes blanqueadores del tipo de los difenilestirilos sustituidos, por ejemplo las sales de metal alcalino de 4,4'-bis(2-sulfoestiril)-difenilo, 4,4'-bis(4-cloro-3-sulfoestiril)-difenilo o 4-(4-cloroestiril)-4'-(2-sulfoestiril)-difenilo. Se pueden usar también mezclas de los blanqueadores ópticos que se han mencionado anteriormente.

40 Los inhibidores de agrisado tienen la tarea de mantener suspendida en el baño la suciedad desprendida de la fibra textil. Para esto son adecuados coloides solubles en agua, la mayoría de las veces de naturaleza orgánica, por ejemplo almidón, cola, gelatina, sales de ácidos etercarboxílicos o ácidos etersulfónicos de almidón o de celulosa o sales de ésteres de ácido sulfúrico ácidos de celulosa o de almidón. Para este fin son adecuadas también poliamidas solubles en agua que contienen grupos ácidos. Además se pueden usar derivados de almidón diferentes de los mencionados anteriormente, por ejemplo almidones de aldehído. Preferentemente se emplean éteres de celulosa, tales como carboximetilcelulosa (sal de Na), metilcelulosa, hidroxialquilcelulosa y éteres mixtos, tales como metilhidroxietilcelulosa, metilhidroxipropilcelulosa, metilcarboximetilcelulosa y sus mezclas, por ejemplo, en cantidades del 0,1 al 5 % en peso en relación con los agentes.

45 Para causar una protección frente a la corrosión de plata, en los agentes de limpieza de acuerdo con la invención para vajilla se pueden emplear inhibidores de la corrosión de plata. Estos son conocidos por el estado de la técnica, por ejemplo, benzotriazoles, cloruro de hierro (III) o CoSO_4 . Como es sabido, los inhibidores de corrosión de plata particularmente adecuados para el uso conjunto con enzimas son sales y/o complejos de manganeso, titanio, zirconio, hafnio, vanadio, cobalto o cerio en los que los metales mencionados están presentes en uno de los niveles de oxidación II, III, IV, V o VI. Son ejemplos de tales compuestos MnSO_4 , V_2O_5 , V_2O_4 , VO_2 , TiOSO_4 , K_2TiF_6 , K_2ZrF_6 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_3$, así como sus mezclas.

50 Los principios activos "de lavado facilitado" o "repelentes de suciedad" la mayoría de las veces son polímeros que

con el uso en un agente de lavado otorgan a la fibra de ropa propiedades de repulsión de la suciedad y/o respaldan la capacidad de desprendimiento de suciedad de los restantes constituyentes del agente de lavado. Se puede observar un efecto comparable también en caso de su uso en agentes de limpieza para superficies duras.

5 Son principios activos de lavado facilitado particularmente eficaces y conocidos desde hace tiempo copoliésteres con unidades de ácido dicarboxílico, alquilenglicol y polialquilenglicol. Son ejemplos de esto copolímeros o polímeros mixtos de poli(tereftalato de etileno) y polioxietilenglicol y agentes ácidos que contienen, entre otros, un copolímero de un ácido carboxílico dibásico y un alquilen- o cicloalquilenpoliglicol. Se pueden emplear asimismo de forma ventajosa polímeros de tereftalato de etileno y tereftalato de poli(óxido de etileno) así como copoliésteres de etilenglicol, polietilenglicol, ácido dicarboxílico aromático y ácido dicarboxílico aromático sulfonado en determinadas relaciones molares. Además son conocidos poliésteres cerrados terminalmente con grupos metilo o etilo con unidades de tereftalato de etileno y/o propileno y tereftalato de poli(óxido de etileno) y agentes de lavado que contienen un polímero de lavado facilitado de este tipo y poliésteres que, aparte de grupos oxietileno y unidades de ácido tereftálico, contienen también unidades de etileno sustituidas así como unidades de glicerina. Además son conocidos poliésteres que, aparte de grupos oxietileno y unidades de ácido tereftálico, contienen grupos 1,2-propileno, 1,2-butileno y/o 3-metoxi-1,2-propileno así como unidades de glicerina y están cerrados con grupos terminales con grupos alquilo de C₁ a C₄ y poliésteres cerrados con grupo terminal al menos en parte por restos alquilo C₁₋₄ o acilo con unidades de poli(tereftalato de propileno) y tereftalato de polioxietileno. Se conocen también poliésteres de lavado facilitado que contienen tereftalato cerrados con grupo terminal sulfoetileno y poliésteres de lavado facilitado preparados mediante sulfonación de grupos terminales insaturados con unidades de tereftalato, alquilenglicol y poli-C₂₋₄-glicol. Además son conocidos poliésteres ácidos aromáticos con capacidad de desprendimiento de suciedad y principios activos repelentes de suciedad no poliméricos para materiales de algodón con varias unidades funcionales: una primera unidad que, por ejemplo, puede ser catiónica tiene capacidad de adsorción sobre la superficie de algodón mediante interacción electrostática y una segunda unidad, que está configurada de forma hidrófoba, es responsable de la permanencia del principio activo en la superficie límite agua/algodón.

A los inhibidores de la transferencia de color que se consideran para el empleo en agentes de lavado de materiales textiles de acuerdo con la invención pertenecen, en particular, polivinilpirrolidonas, polivinilimidazoles, *N*-óxidos poliméricos tales como poli(*N*-óxido de vinilpiridina) y copolímeros de vinilpirrolidona con vinilimidazol.

30 En el caso del empleo en procedimientos de limpieza a máquina puede ser ventajoso añadir inhibidores de espuma a los agentes. Como inhibidores de espuma son adecuados, por ejemplo, jabones de origen natural o sintético que presentan una elevada parte de ácidos grasos C₁₈-C₂₄. Son inhibidores de espuma de tipo no tensioactivo adecuados, por ejemplo, organopolisiloxanos y sus mezclas con ácido silícico microfino, dado el caso silanizado, así como parafinas, ceras, ceras microcristalinas y sus mezclas con ácido silícico silanizado o biesteariletildiamida. Ventajosamente se usan también mezclas de distintos inhibidores de espuma, por ejemplo, aquellos de silicona, parafinas o ceras. Preferentemente, los inhibidores de espuma, en particular inhibidores de espuma que contienen silicona y/o parafina, están unidos a una sustancia de soporte granular, soluble o dispersable en agua. En particular, a este respecto se prefieren mezclas de parafinas y biesteariletildiamidas.

40 Por la solicitud no publicada previamente DE 102004020430.6 se obtienen agentes de limpieza, en particular agentes para el lavado a máquina de la vajilla, que contienen un copolímero de (i) ácidos carboxílicos insaturados, (ii) monómeros que contienen grupos ácido sulfónico y (iii) opcionalmente otros monómeros iónicos o no ionógenos y una variante especial de α -amilasa. Estos copolímeros se pueden combinar también con α -amilasas que se corresponden con la presente invención, en particular cuando, aparte de las sustituciones de acuerdo con la invención, presentan aquellas que se pueden obtener de una o varias de las solicitudes WO 96/23873 A1, WO 00/60060 A2 y WO 01/66712 A2. Esto se aplica en particular para el caso en el que el producto comercial que se incluye en estas solicitudes Stainzyme[®] de la empresa Novozymes se mejora en otras posiciones y adicionalmente se provee de al menos una sustitución de acuerdo con la invención. De hecho, en principio se tiene que partir de un efecto aditivo de las distintas modificaciones.

50 Un agente de limpieza de acuerdo con la invención para superficies duras además puede contener constituyentes de efecto abrasivo, en particular del grupo que comprende polvos de cuarzo, polvos de madera, polvos de plástico, cetas y microbolas de vidrio así como sus mezclas. Están contenidas sustancias abrasivas en los agentes de limpieza de acuerdo con la invención preferentemente no por encima del 20 % en peso, en particular del 5 % en peso al 15 % en peso.

55 Se añaden colorantes y fragancias a los agentes de lavado y limpieza para mejorar el aspecto estético de los productos y poner a disposición para el consumidor, además del poder de lavado y limpieza, un producto visual y sensorialmente "típico e inconfundible". Como aceites perfumados o fragancias se pueden usar compuestos individuales de sustancia olorosa, por ejemplo, los productos sintéticos del tipo de los ésteres, éteres, aldehídos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos. Son compuestos de sustancias olorosas del tipo de los ésteres, por ejemplo, acetato de bencilo, isobutirato de fenoxietilo, acetato de *p*-*terc*-butilciclohexilo, acetato de linalilo, carbinilacetato de dimetilbencilo, acetato de feniletilo, benzoato de linalilo, formiato de bencilo, glicinato de etilmetilfenilo, propionato de alilciclohexilo, propionato de estiralilo y salicilato de bencilo. A los éteres pertenecen, por ejemplo, éter de benciletilo, a los aldehídos, por ejemplo, los alcanales lineales con 8-18 átomos de C, citral, citronelal, citroneliloxiacetaldehído,

ciclamenaldehído, hidroxicitronelal, lialial y bourgeonal, a las cetonas, por ejemplo, las jononas, α -isometiljonona y metil-cedrilcetona, a los alcoholes anetol, citronelol, eugenol, geraniol, linalool, alcohol fenilético y terpineol, a los hidrocarburos pertenecen principalmente los terpenos, tales como limoneno y pineno. Sin embargo, se usan preferentemente mezclas de distintas sustancias olorosas que generan conjuntamente una nota de olor agradable.

- 5 Tales aceites perfumados pueden contener también mezclas de sustancias olorosas naturales, como se pueden obtener de fuentes vegetales, por ejemplo, aceite de pino, cítrico, jazmín, pachuli, rosas o ylang-ylang. También son adecuados moscatel, aceite de salvia, aceite de manzanilla, aceite de clavel, aceite de toronjil, aceite de menta, aceite de hojas de canela, aceite de tila, aceite de enebro, aceite de vetiver, aceite de olíbano, aceite de galbano y aceite de labdano, así como aceite de flor de naranja, neroliol, aceite de cáscara de naranja y aceite de sándalo.
- 10 Habitualmente, el contenido de en colorantes se encuentra por debajo del 0,01 % en peso, mientras que las fragancias pueden ser hasta el 2 % en peso de toda la formulación.

Las fragancias pueden incluirse directamente en los agentes de lavado y limpieza, pero puede ser ventajoso también aplicar las fragancias sobre soportes que refuerzan la adherencia del perfume sobre el material de limpieza y proporcionan una fragancia de larga duración mediante una liberación de la fragancia más lenta, particularmente de

15 materiales textiles tratados. Como materiales de soportes de este tipo han dado buen resultado por ejemplo ciclodextrinas, pudiendo revestirse los complejos de ciclodextrina-perfume adicionalmente también con coadyuvantes adicionales. Otro soporte preferente para fragancias es la zeolita X descrita que, en lugar o en mezcla con tensioactivos, puede absorber también fragancias. Por tanto, se prefieren agentes de lavado y limpieza que contienen la zeolita X descrita y fragancias que están absorbidas preferentemente al menos en parte en la zeolita.

- 20 Colorantes preferidos, cuya elección no causa dificultad alguna al experto, tienen una alta estabilidad en almacenamiento y una insensibilidad frente a los restantes ingredientes de los agentes y contra la luz así como ninguna afinidad marcada con respecto a las fibras textiles, para no teñir las mismas.

Para combatir microorganismos, los agentes de lavado o limpieza pueden contener principios activos antimicrobianos. En este caso se diferencia, en función del espectro antimicrobiano y el mecanismo de acción, entre bacteriostáticos y bactericidas, fungistáticos y fungicidas, etc. Son sustancias importantes de estos grupos, por ejemplo, cloruros de benzalconio, sulfonatos de alquilarilo, halofenoles y mercuriacetato de fenol. Los términos efecto antimicrobiano y principio activo antimicrobiano en el marco de la enseñanza de acuerdo con la invención tienen el significado habitual en la técnica. Los principios activos antimicrobianos adecuados están seleccionados preferentemente de los grupos de los alcoholes, aminas, aldehídos, ácidos antimicrobianos o sus sales, ésteres de ácido carboxílico, amidas de ácido, fenoles, derivados de fenol, difenilos, difenilalcanos, derivados de urea, acetales y formales de oxígeno, nitrógeno, benzamidas, isotiazolinas, derivados de ftalimida, derivados de piridina, compuestos antimicrobianos con actividad superficial, guanidinas, compuestos anfóteros antimicrobianos, quinolinas, 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano, carbamato de yodo-2-propil-butilo, yodo, yodóforos, compuestos peroxo, compuestos halogenados así como mezclas discrecionales de los anteriores.

- 35 A este respecto, el principio activo antimicrobiano puede estar seleccionado de etanol, *n*-propanol, *i*-propanol, 1,3-butanodiol, fenoxietanol, 1,2-propilenglicol, glicerina, ácido undecilénico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido dihidracético, *o*-fenilfenol, *N*-metilmorfolinacetónitrilo (MMA), 2-bencil-4-clorofenol, 2,2'-metilen-bis-(6-bromo-4-clorofenol), éter de 4,4'-diclor-2'-hidroxidifenilo (diclosan), éter de 2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenilo (triclosan), clorhexidina, *N*-(4-clorofenil)-*N*-(3,4-diclorofenil)-urea, diclorhidrato de *N,N'*-(1,10-decan-diildi-1-piridinil-4-iliden)-bis-(1-octanamina), *N,N'*-Bis-(4-clorofenil)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraaza-tetradecandiimidamida, glucoprotaminas, compuestos cuaternarios antimicrobianos con actividad superficial, guanidinas incluyendo las bi- y poliguanidinas, tales como, por ejemplo, diclorhidrato de 1,6-bis-(2-etilhexil-biguanido-hexano), tetraclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-fenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, diclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-fenil-*N*₁,*N*₁-metildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, diclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-*o*-clorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, diclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-2,6-diclorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, diclorhidrato de 1,6-di-[*N*₁,*N*₁'-beta-(*p*-metoxifenil)diguanido-*N*₅,*N*₅']-hexano, diclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-alfa-metil-beta-fenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, diclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-*p*-nitrofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, diclorhidrato de éter de omega:omega-di-(*N*₁,*N*₁'-fenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-di-*n*-propilo, tetraclorhidrato de éter de omega:omega-di-(*N*₁,*N*₁'-*p*-clorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-di-*n*-propilo, tetraclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-2,4-diclorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, diclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-*p*-metilfenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, tetraclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-2,4,5-triclorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, diclorhidrato de 1,6-di-[*N*₁,*N*₁'-alfa-(*p*-clorofenil)etildiguanido-*N*₅,*N*₅']-hexano, diclorhidrato de omega:omega-di-(*N*₁,*N*₁'-*p*-clorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-*m*-xileno, diclorhidrato de 1,12-di-(*N*₁,*N*₁'-*p*-clorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-dodecano, tetraclorhidrato de 1,10-di-(*N*₁,*N*₁'-fenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-decano, tetraclorhidrato de 1,12-di-(*N*₁,*N*₁'-fenil)diguanido-*N*₅,*N*₅')-dodecano, diclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-*o*-clorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, tetraclorhidrato de 1,6-di-(*N*₁,*N*₁'-*o*-clorofenildiguanido-*N*₅,*N*₅')-hexano, etilen-bis-(1-tolil biguanida), etilen-bis-(*p*-tolil biguanida), etilen-bis-(3,5-dimetilfenilbiguanida), etilen-bis-(*p*-terc-amilfenilbiguanida), etilen-bis-(nonilfenilbiguanida), etilen-bis-(fenilbiguanida), etilen-bis-(*N*-butilfenilbiguanida), etilen-bis (2,5-dietoxifenilbiguanida), etilen-bis (2,4-dimetilfenil biguanida), etilen-bis (*o*-difenil-biguanida), etilen-bis (amil naftilbiguanida mixta), *N*-butil-etilen-bis-(fenilbiguanida), trimetilen bis (*o*-tolilbiguanida), *N*-butil-trimete-bis-(fenil biguanida) y las correspondientes tales como acetatos, gluconatos, clorhidratos, bromhidratos, citratos, bisulfitos, fluoruros, polimaleatos, sarcosinatos de *N*-cocosalquilo, fosfitos, hipofosfitos, perfluorooctanoatos, silicatos, sorbatos, salicilatos, maleatos, tartratos, fumaratos, etilendiamintetraacetato, iminodiacetato, cinnamato, tiocianato, arginato, piromelitato, tetracarboxibutirato, benzoato, glutarato, monofluorofosfato, perfluoropropionato así como mezclas discrecionales de los mismos. Además son adecuados derivados halogenados de xileno y cresol
- 60

tales como *p*-cloro-metacresol, o *p*-cloro-meta-xileno, así como principios activos antimicrobianos naturales de origen vegetal (por ejemplo de especias o hierbas), de origen animal así como microbiano. Preferentemente se pueden emplear compuestos cuaternarios con actividad superficial de efecto antimicrobiano, un principio activo antimicrobiano natural de origen vegetal y/o un principio activo antimicrobiano natural de origen animal, de forma extremadamente preferente al menos un principio activo antimicrobiano natural de origen vegetal del grupo que comprende cafeína, teobromina y teofilina así como aceites esenciales tales como eugenol, timol y geraniol y/o al menos un principio activo antimicrobiano natural de origen animal del grupo que comprende enzimas tales como albúmina de leche, lisozima y lactoperoxidasa y/o al menos un compuesto cuaternario con actividad superficial de efecto antimicrobiano con un grupo amonio, sulfonio, fosfonio, yodonio o arsonio, compuestos peroxo y compuestos de cloro. Se pueden emplear también sustancias de origen microbiano, las denominadas bacteriocinas.

Los compuestos de amonio cuaternarios (CAC) adecuados como principios activos antimicrobianos presentan la fórmula general $(R^1)(R^2)(R^3)(R^4) N^+ X^-$, en la que R^1 a R^4 representan restos alquilo C_1 - C_{22} iguales o distintos, restos aralquilo C_7 - C_{28} o restos heterocíclicos, formando dos, o en el caso de una inclusión aromática tal como en la piridina, incluso tres restos junto con el átomo de nitrógeno el heterociclo, por ejemplo un compuesto de piridinio o imidazolinio y X^- son iones halógeno, iones sulfato, iones hidróxido o aniones similares. Para un efecto antimicrobiano óptimo, preferentemente al menos uno de los restos presenta una longitud de cadena de 8 a 18, en particular de 12 a 16 átomos de C.

Los CAC se pueden preparar mediante reacción de aminas terciarias con agentes de alquilación tales como, por ejemplo, cloruro de metilo, cloruro de bencilo, sulfato de dimetilo, bromuro de docecilo, pero también óxido de etileno. La alquilación de aminas terciarias con un resto alquilo largo y dos grupos metilo se consigue de forma particularmente sencilla, también se puede llevar a cabo la cuaternización de aminas terciarias con dos restos largos y un grupo metilo con ayuda de cloruro de metilo en condiciones poco rigurosas. Las aminas que disponen de tres restos alquilo largos o restos alquilo sustituidos con hidroxilo son menos reactivas y se cuaternizan preferentemente con sulfato de dimetilo.

Son CAC adecuados por ejemplo cloruro de benzalconio (cloruro de *N*-alquil-*N,N*-dimetil-bencil-amonio, CAS n.º 8001-54-5), benzalconio B (cloruro de *m,p*-diclorobencil-dimetil-alquil- C_{12} -amonio, CAS n.º 58390-78-6), cloruro de benzoxonio (cloruro de bencil-dodecil-bis-(2-hidroxietil)-amonio), bromuro de cetrimonio (bromuro de *N*-hexadecil-*N,N*-trimetil-amonio, CAS n.º 57-09-0), cloruro de bencetonio (cloruro de *N,N*-dimetil-*N*-[2-[2-[*p*-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxi]etoxi]etil]-bencilamonio, CAS n.º 121-54-0), cloruros de dialquildimetilamonio tales como cloruro de di-*n*-decil-dimetil-amonio (CAS n.º 7173-51-5-5), bromuro de didecildi-metilamonio (CAS n.º 2390-68-3), cloruro de dioctildimetil-amonio, cloruro de 1-cetilpiridinio (CAS n.º 123-03-5) y yoduro de tiazolina (CAS n.º 15764-48-1) así como sus mezclas. Son CAC particularmente preferentes los cloruros de benzalconio con restos alquilo C_8 - C_{18} , en particular cloruro de alquil- C_{12} - C_{14} -bencil-dimetil-amonio.

Los halogenuros de benzalconio y/o halogenuros de benzalconio sustituidos están disponibles en el mercado por ejemplo como Barquat® de Lonza, Marquat® de Mason, Variquat® de Witco/ Sherex e Hyamine® de Lonza, así como Bardac® de Lonza. Otros principios activos antimicrobianos disponibles en el mercado son cloruro de *N*-(3-cloroalil)-hexaminio tal como Dowicide® y Dowicil® de Dow, cloruro de bencetonio tal como Hyamine® 1622 de Rohm & Haas, cloruro de metilbencetonio tal como Hyamine® 10X de Rohm & Haas, cloruro de cetilpiridinio tal como cloruro de Cepacol de Merrell Labs.

Los principios activos antimicrobianos se emplean en cantidades del 0,0001 % en peso al 1 % en peso, preferentemente del 0,001 % en peso al 0,8 % en peso, de forma particularmente preferente del 0,005 % en peso al 0,3 % en peso y en particular del 0,01 al 0,2 % en peso.

Los agentes pueden contener absorbentes de UV (absorbedores de UV) que se aplican sobre los materiales textiles tratados y mejoran la resistencia a la luz de las fibras y/o la resistencia a la luz de otros constituyentes de la formulación. Por absorbedores de UV se ha de entender sustancias orgánicas (filtros fotoprotectores) que están en disposición de absorber rayos ultravioletas y volver a ceder la energía absorbida en forma de radiación de longitud de onda más larga, por ejemplo, calor.

Los compuestos que presentan estas propiedades deseadas son, por ejemplo, los compuestos eficaces mediante desactivación sin radiación y derivados de la benzofenona con sustituyentes en posición 2 y/o 4. Además, también son adecuados benzotriazoles sustituidos, acrilatos sustituidos con fenilo en posición 3 (derivados de ácido cinámico, dado el caso con grupos ciano en posición 2), salicilatos, complejos de Ni orgánicos así como sustancias naturales tales como umbeliferona y el ácido urocánico propio del cuerpo. Tienen una importancia particular los derivados de bifenilo y sobre todo de estilbena que están disponibles en el mercado como Tinosorb® FD o Tinosorb® FR de Ciba. Como absorbedores de UV-B se ha de mencionar: 3-bencilidenalcanfor o 3-bencilidennoralcanfor y sus derivados, por ejemplo 3-(4-metilbenciliden)alcanfor; derivados de ácido 4-aminobenzoico, preferentemente 2-etilhexiléster de ácido 4-(dimetilamino)benzoico, éster de 2-octilo de ácido 4-(dimetilamino)benzoico y éster de amilo de ácido 4-(dimetilamino)benzoico; ésteres del ácido cinámico, preferentemente éster de 2-etilhexilo de ácido 4-metoxicinámico, éster de propilo de ácido 4-metoxicinámico, éster de isoamilo de ácido 4-metoxicinámico, éster de 2-etilhexilo de ácido 2-ciano-3,3-fenilcinámico (octocrilenos); ésteres del ácido salicílico, preferentemente éster de 2-etilhexilo de ácido salicílico, éster de 4-isopropilbencilo de ácido salicílico, éster de homomentilo de ácido salicílico;

derivados de la benzofenona, preferentemente 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, 2-hidroxi-4-metoxi-4'-metilbenzofenona, 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona; ésteres del ácido benzalmalónico, preferentemente éster de di-2-etilhexilo de ácido 4-metoxibenzomalónico; derivados de triazina tales como, por ejemplo, 2,4,6-trianilino-(*p*-carbo-2'-etil-1'-hexiloxi)-1,3,5-triazina y octil triazona o dioctil butamido triazona (Uvasorb® HEB); propan-1,3-diona, tal como, por ejemplo, 1-(4-*terc*-butilfenil)-3-(4'-metoxifenil)propan-1,3-diona; derivados de cetotriciclo(5.2.1.0)decano. Además son adecuados ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales de metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio, alquilamonio, alcanolamonio y glucamonio; derivados de ácido sulfónico de benzofenonas, preferentemente ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenon-5-sulfónico y sus sales; derivados de ácido sulfónico del 3-bencilidenalcanfor tales como, por ejemplo, ácido 4-(2-oxo-3-bornilidenmetil)benceno-sulfónico y ácido 2-metil-5-(2-oxo-3-borniliden)sulfónico y sus sales.

Como filtros UV-A típicos se consideran, en particular, derivados del benzoilmetano, tales como, por ejemplo, 1-(4'-*terc*-butilfenil)-3-(4'-metoxifenil)propan-1,3-diona, 4-*terc*-butil-4'-metoxidibenzoilmetano (Parsol 1789), 1-fenil-3-(4'-isopropilfenil)-propan-1,3-diona así como compuestos de enamina (BASF). Los filtros de UV-A y filtros de UV-B, evidentemente, se pueden emplear también en mezclas. Además de las sustancias solubles mencionadas, para este fin se consideran también pigmentos fotoprotectores insolubles, en concreto óxidos de metal finamente dispersos, preferentemente nanoizados o sales. Son ejemplos de óxidos de metal adecuados, en particular, óxido de cinc y dióxido de titanio y, además, óxidos de hierro, zirconio, silicio, manganeso, aluminio y cerio así como sus mezclas. Como sales se pueden emplear silicatos (talco), sulfato de bario o estearato de cinc. Los óxidos y las sales se usan en forma de los pigmentos ya para emulsiones para el cuidado de la piel y para la protección de la piel y la cosmética decorativa. A este respecto, las partículas deben presentar un diámetro medio de menos de 100 nm, preferentemente entre 5 y 50 nm y en particular entre 15 y 30 nm. Pueden presentar una forma esférica, sin embargo, se pueden emplear también aquellas partículas que presentan una forma elipsoidal o que difiere de otro modo de la forma esférica. Los pigmentos pueden estar presentes también tratados en la superficie, es decir, hidrofiliados o hidrofobizados. Los ejemplos típicos son dióxidos de titanio revestidos tales como, por ejemplo, dióxido de titanio T 805 (Degussa) o Eusolex® T2000 (Merck; como agentes de revestimiento hidrófobos se consideran para esto preferentemente siliconas y de forma particularmente preferente trialcoxiocetilsilano o simeticona. Preferentemente se usa óxido de cinc micronizado.

Los absorbedores de UV se usan habitualmente en cantidades del 0,01 % en peso al 5 % en peso, preferentemente del 0,03 % en peso al 1 % en peso.

Los agentes de acuerdo con la invención para aumentar el poder de lavado o de limpieza, aparte de las variantes de acuerdo con la invención de α -amilasa, pueden contener otras enzimas, pudiendo emplearse en principio todas las enzimas establecidas para estos fines en el estado de la técnica. A esto pertenecen en particular proteasas, otras amilasas, lipasas, hemicelulasas, celulasas u oxidorreductasas, así como preferentemente sus mezclas. Estas enzimas en principio son de origen natural; partiendo de las moléculas naturales están disponibles para el empleo en agentes de lavado y limpieza variantes mejoradas que se emplean correspondientemente con preferencia. Los agentes de acuerdo con la invención contienen enzimas preferentemente en cantidades totales de 1×10^{-8} al 5 por ciento en peso en relación con la proteína activa. La concentración de proteínas se puede determinar con ayuda de procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento de BCA (ácido bicincoínico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M. M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), pág. 751-766).

Entre las proteasas se prefieren aquellas del tipo subtilisina. Son ejemplo de esto las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*, la subtilisina DY y las enzimas a asignar a las subtilasas, sin embargo, ya no a las subtilisinas en el sentido más estricto termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7. La subtilisina Carlsberg está disponible en una forma perfeccionada con el nombre comercial Alcalase® en la empresa Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca. Las subtilisinas 147 y 309 se comercializan con el nombre comercial Esperase® o Savinase® por la empresa Novozymes. De la proteasa de *Bacillus lentus* DSM 5483 (documento WO 91/02792 A1) se derivan las variantes comercializadas con la denominación BLAP® que se describen en particular en los documentos WO 92/21760 A1, WO 95/23221 A1, WO 02/088340 A2 y WO 03/038082 A2. Otras proteasas que se pueden usar de distintos *Bacillus sp.* y *B. gibsonii* se obtienen de las solicitudes de patente WO 03/054185 A1, WO 03/056017 A2, WO 03/055974 A2 y WO 03/054184 A1.

Otras proteasas útiles son, por ejemplo, las enzimas disponibles con el nombre comercial Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym, Natalase®, Kannase® y Ovozyme® de la empresa Novozymes, con el nombre comercial Purafect®, Purafect® OxP y Properase® de la empresa Genencor, con el nombre comercial Protosol® de la empresa Advanced Biochemicals Ltd., Thane, India, con el nombre comercial Wuxi® de la empresa Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, con el nombre comercial Proleather® y Protease P® de la empresa Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japón y con la denominación proteinasa K-16 de la empresa Kao Corp., Tokio, Japón.

Son ejemplos de amilasas que se pueden emplear adicionalmente de acuerdo con la invención las α -amilasas de *Bacillus licheniformis*, de *B. amyloliquefaciens* o de *B. stearothermophilus* así como sus perfeccionamientos mejorados para el empleo en agentes de lavado o limpieza. La enzima de *B. licheniformis* está disponible en la empresa Novozymes con el nombre Termamyl® y en la empresa Genencor con el nombre Purastar®ST. Están

disponibles productos perfeccionados de esta α -amilasa en la empresa Novozymes con el nombre comercial Duramyl® y Termamyl® ultra, en la empresa Genencor con el nombre Purastar® OxAm y en la empresa Daiwa Seiko Inc., Tokio, Japón como Keistase®. La α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* se comercializa por la empresa Novozymes con el nombre BAN®, y variantes derivadas de la α -amilasa de *B. stearrowthermophilus* con el nombre BSG® y Novamyl®, también de la empresa Novozymes.

Además, para este fin se han de destacar la α -amilasa de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) desvelada en la solicitud WO 02/10356 A2 y la ciclodextrina-glucanotransferasa (CGTasa) de *B. agaradherens* (DSM 9948) descrita en la solicitud WO 02/44350 A2. Además se pueden emplear las enzimas amilolíticas que pertenecen al espacio de secuencia de las α -amilasas que se define en la solicitud WO 03/002711 A2 y las que se describen en la solicitud WO 03/054177 A2. Asimismo se pueden emplear productos de fusión de las moléculas mencionadas, por ejemplo los de la solicitud DE 10138753 A1 o mutaciones puntuales de los mismos.

Además son adecuados los perfeccionamientos disponibles con el nombre comercial Fungamyl® de la empresa Novozymes de la α -amilasa de *Aspergillus niger* y *A. oryzae*. Otros productos comerciales que se pueden emplear son, por ejemplo, Amylase-LT® y Stainzyme®, esta última también de la empresa Novozymes.

Los agentes de acuerdo con la invención pueden contener lipasas o cutinasas, en particular debido a sus actividades de escisión de triglicéridos, pero también para generar perácidos *in situ* a partir de precursores adecuados. A esto pertenecen por ejemplo las lipasas obtenidas originalmente de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*) o perfeccionadas, en particular aquellas con la sustitución de aminoácidos D96L. Se comercializan, por ejemplo, por la empresa Novozymes con el nombre comercial Lipolase®, Lipolase® Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® y Lipex®. Además se pueden emplear, por ejemplo, las cutinasas que se han aislado originalmente de *Fusarium solani pisi* y *Humicola insolens*. Se pueden obtener también lipasas útiles en la empresa Amano con las denominaciones Lipase CE®, Lipase P®, Lipase B® o Lipase CES®, Lipase AKG®, *Bacillus sp.* Lipase®, Lipase AP®, Lipase M-AP® y Lipase AML®. De la empresa Genencor se pueden emplear, por ejemplo, las lipasas o cutinasas cuyas enzimas de partida se han aislado originalmente de *Pseudomonas mendocina* y *Fusarium solanii*. Como otros productos comerciales importantes se han de mencionar las preparaciones comercializadas originalmente por la empresa Gist-Brocades M1 Lipase® y Lipomax® y las enzimas comercializadas por la empresa Meito Sangyo KK, Japón con el nombre Lipase MY-30®, Lipase OF® y Lipase PL®, además el producto Lumafast® de la empresa Genencor.

Los agentes de acuerdo con la invención, particularmente cuando están concebidos para el tratamiento de materiales textiles, pueden contener celulasas, dependiendo del fin como enzimas puras, como preparaciones enzimáticas o en forma de mezclas en las que los componentes individuales se complementan ventajosamente en relación con sus distintos aspectos de rendimiento. A estos aspectos de rendimiento pertenecen, en particular, contribuciones al rendimiento de lavado primario, al rendimiento de lavado secundario del agente (efecto anti-redeposición o inhibición de agrisado) y avivado (efecto de tejido) hasta el ejercicio de un efecto de "lavado a piedra".

Una preparación de celulasa rica en endoglucanasa (EG) fúngica útil o sus perfeccionamientos se ofrecen por la empresa Novozymes con el nombre comercial Celluzyme®. Los productos disponibles también en la empresa Novozymes Endolase® y Carezyme® se basan en la EG de 50 kD o la EG de 43 kD de *H. insolens* DSM 1800. Otros productos comerciales útiles de esta empresa son Cellusoft® y Renozyme®. La última se basa en la solicitud WO 96/29397 A1. Se obtienen variantes de celulasa mejoradas en cuanto al rendimiento por ejemplo por la solicitud WO 98/12307 A1. Además se pueden emplear las celulasas desveladas en la solicitud WO 97/14804 A1, por ejemplo, la EG desvelada allí de 20 kD de *Melanocarpus*, que se puede obtener de la empresa AB Enzymes, Finlandia, con el nombre comercial Ecostone® y Biotouch®. Otros productos comerciales de la empresa AB Enzymes son Econase® y Ecopulp®. Otras celulasas adecuadas de *Bacillus sp.* CBS 670.93 y CBS 669.93 se desvelan en el documento WO 96/34092 A2, obteniéndose la de *Bacillus sp.* CBS 670.93 de la empresa Genencor con el nombre comercial Puradax®. Otros productos comerciales de la empresa Genencor son "Genencor detergent cellulase L" e IndiAge® Neutra.

Los agentes de acuerdo con la invención en particular para la eliminación de determinados ensuciamientos problemáticos pueden contener otras enzimas que se compilan en el término hemicelulasas. A esto pertenecen, por ejemplo, mananasas, xantaniasas, pectiniasas (=pectinasas), pectinesterasas, pectatiasas, xiloglucanasas (=xilanasas), pululanasas y β -glucanasas. Están disponibles mananasas adecuadas, por ejemplo, con el nombre Gamanase® y Pektinex AR® de la empresa Novozymes, con el nombre Rohapec® B1L de la empresa AB Enzymes, con el nombre Pyrolase® de la empresa Diversa Corp., San Diego, CA, EE.UU y con el nombre Purabrite® de la empresa Genencor Int., Inc., Palo Alto, CA, EE.UU. Por ejemplo por la solicitud WO 99/06573 A1 se obtiene una β -glucanasa adecuada de un *B. alcalophilus*. La β -glucanasa obtenida de *B. subtilis* se puede obtener con el nombre Cereflo® de la empresa Novozymes.

Para aumentar el efecto de blanqueo, los agentes de lavado y limpieza de acuerdo con la invención pueden contener oxidorreductasas, por ejemplo, oxidasas, oxigenasas, catalasas, peroxidasas, tales como halo-, cloro-,

bromo-, lignina-, glucosa- o manganeso-peroxidadas, dioxigenasas o lacasas (fenoloxidasas, polifenoloxidasas). Como productos comerciales adecuados se ha de mencionar Denilite® 1 y 2 de la empresa Novozymes. Se hace referencia a la solicitud WO 98/45398 A1 como sistemas de ejemplo que se pueden emplear ventajosamente para una perhidrólisis enzimática. El documento WO 2004/058955 A2 desvela por ejemplo colinoxidasas útiles para un sistema de este tipo. Se obtienen proteasas modificadas con actividad perhidrolasa marcada, que se puede emplear en este punto también de manera ventajosa, en particular para conseguir un leve blanqueo en agentes de lavado de materiales textiles, por la solicitud WO 2004/058961 A1. Un sistema de blanqueo enzimático combinado que comprende una oxidasa y una perhidrolasa lo describe la solicitud DE 102004029475.5. También el documento WO 2005/056782 A2 describe otras perhidrolasas que se pueden emplear de acuerdo con la invención. Ventajosamente se añaden adicionalmente compuestos preferentemente orgánicos, de forma particularmente preferente aromáticos, que interaccionan con las enzimas para reforzar (potenciadores) la actividad de las respectivas oxidorreductasas o para garantizar (mediadores) en caso de potenciales redox muy diferentes entre las enzimas oxidantes y los ensuciamientos el flujo de electrones.

Las enzimas empleadas en agentes de acuerdo con la invención proceden originalmente de microorganismos, por ejemplo, de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola* o *Pseudomonas* y/o se producen según procedimientos biotecnológicos en sí conocidos por microorganismos adecuados, por ejemplo, por huéspedes transgénicos de expresión de los géneros *Bacillus* o por hongos filamentosos.

La purificación de las respectivas enzimas se realiza, de forma adecuada, a través de procedimientos en sí establecidos, por ejemplo, mediante precipitación, sedimentación, concentración, filtración de las fases líquidas, microfiltración, ultrafiltración, acción de agentes químicos, acción desodorizante o combinaciones adecuadas de estas etapas.

Las enzimas pueden añadirse a los agentes de acuerdo con la invención en cualquier forma establecida de acuerdo con el estado de la técnica. A estas pertenecen por ejemplo las preparaciones sólidas obtenidas mediante granulación, extrusión o liofilización o, en particular en el caso de agentes líquidos o en forma de gel, soluciones de las enzimas, de manera ventajosa en la medida de lo posible concentradas, escasas en agua y/o mezcladas con estabilizantes.

Como alternativa, las enzimas pueden encapsularse tanto para la forma de presentación sólida como para la forma de presentación líquida, por ejemplo mediante secado por pulverización o extrusión de la solución de enzima junto con un polímero, preferentemente natural o en forma de cápsulas, por ejemplo aquellas en las que las enzimas están encerradas tal como en un gel rígido o en aquellas del tipo núcleo-envuelta, en el que un núcleo que contiene enzima está revestido con una capa protectora impermeable al agua, al aire y/o a productos químicos. En capas superpuestas pueden aplicarse adicionalmente otros principios activos, por ejemplo estabilizantes, emulsionantes, pigmentos, blanqueantes o colorantes. Las cápsulas de este tipo se aplican de acuerdo con procedimientos en sí conocidos, por ejemplo mediante granulación con vibración o de rodillo o en procedimientos de lecho fluidizado. De manera ventajosa los granulados de este tipo, por ejemplo mediante aplicación de agentes filmógenos poliméricos, tienen poco polvo y son estables en almacenamiento gracias al revestimiento.

Además es posible confeccionar dos o varias enzimas juntas, de modo que un granulado individual presente varias actividades enzimáticas.

Una proteína y/o enzima contenida en un agente de acuerdo con la invención puede protegerse especialmente durante el almacenamiento frente a daños tales como por ejemplo inactivación, desnaturalización o descomposición por ejemplo por influencias físicas, oxidación o escisión proteolítica. En el caso de la obtención microbiana de las proteínas y/o enzimas se prefiere especialmente una inhibición de la proteólisis, en particular cuando los agentes contienen también proteasas. Los agentes de acuerdo con la invención preferentes pueden contener para este fin estabilizantes.

Un grupo de estabilizantes son inhibidores de proteasas reversibles. Con frecuencia se usan para esto clorhidrato de benzamidina, borax, ácidos bóricos, ácidos borónicos o sus sales o ésteres, entre ellos sobre todo derivados con grupos aromáticos, por ejemplo ácidos fenilborónicos orto-sustituídos, meta-sustituídos o para-sustituídos, particularmente el ácido 4-formilfenil-borónico, o las sales o ésteres de los compuestos mencionados. Con este fin se emplean también aldehídos de péptido, es decir, oligopéptidos con extremo C reducido, en particular los de 2 a 50 monómeros. A los inhibidores de proteasa reversibles péptidos pertenecen, entre otros, ovomucoide y leupeptina. Para esto son adecuados también inhibidores péptidos reversibles específicos para la proteasa subtilisina así como proteínas de fusión de proteasas e inhibidores péptidos específicos.

Otros estabilizantes de enzima son aminoalcoholes tales como mono-, di-, trietanol- y -propanolamina y mezclas de los mismos, ácidos carboxílicos alifáticos hasta C₁₂, tales como por ejemplo ácido succínico, otros ácidos dicarboxílicos o sales de los ácidos mencionados. También son adecuados alcoxiolatos de amida de ácido graso cerrados con grupos terminales para este fin. Los ácidos orgánicos usados adecuados como soporte pueden adicionalmente estabilizar una enzima contenida, tal como se desvela en el documento WO 97/18287.

Alcoholes alifáticos inferiores, pero sobre todo polioles, tales como por ejemplo glicerol, etilenglicol, propilenglicol o

sorbitol son estabilizantes de enzima adicionales usados con frecuencia. También di-glicerinfosfato protege frente a desnaturalización por influencias físicas. Asimismo se usan sales de calcio y/o magnesio, tales como por ejemplo acetato de calcio o formiato de calcio.

5 Oligómeros de poliamida o compuestos poliméricos tales como lignina, copolímeros de vinilo solubles en agua o éteres de celulosa, polímeros acrílicos y/o poliamidas estabilizan la preparación de enzima entre otros frente a influencias físicas o variaciones del valor de pH. Los polímeros que contienen poliamina-N-óxido actúan al mismo tiempo como estabilizantes de enzima y como inhibidores de la transferencia de color. Otros estabilizantes poliméricos son los polioxialquilenos C₈-C₁₈ lineales. Los alquilpoliglucósidos pueden estabilizar los componentes enzimáticos del medio de acuerdo con la invención e incluso aumentarlo con preferencia adicionalmente en su rendimiento. Los compuestos que contienen N reticulados actúan así mismo preferentemente con función doble de agentes de lavado facilitado y estabilizantes de enzima. El polímero no iónico hidrófobo estabiliza en particular una celulosa dado el caso contenida.

10 Los agentes de reducción y antioxidantes aumentan la estabilidad de las enzimas frente a descomposición oxidativa; para esto son habituales por ejemplo agentes de reducción que contienen azufre. Otros ejemplos son sulfito de sodio y azúcares reductores.

15 De forma particularmente preferente se usan combinaciones de estabilizantes, por ejemplo de polioles, ácido bórico y/o borax, la combinación de ácido bórico o borato, sales reductoras y ácido succínico u otros ácidos dicarboxílicos o la combinación de ácido bórico o borato con polioles o poliaminocompuestos y con sales reductoras. La acción de estabilizantes de péptido-aldehído se aumenta de manera adecuada mediante la combinación con ácido bórico y/o derivados de ácido bórico y polioles y adicionalmente mediante el efecto adicional de cationes divalentes, tales como por ejemplo iones calcio.

20 Los agentes de acuerdo con la invención en una forma de realización preferente están caracterizados porque, para liberar por ejemplo los principios activos contenidos separados unos de otro en el tiempo o en el espacio, están compuestos de más de una fase. A este respecto se puede tratar de fases en distintos estados de agregación, pero en particular de fases en el mismo estado de agregación.

25 Los agentes de acuerdo con la invención que están compuestos de más de un componente sólido se pueden preparar de forma sencilla al mezclarse distintos componentes sólidos, en particular polvo, granulados o extruidos, con distintos ingredientes y/o diferente comportamiento de liberación en una forma en su totalidad suelta. La preparación de agentes sólidos de acuerdo con la invención de una o varias fases se puede realizar de forma conocida, por ejemplo, mediante secado por pulverización o granulación, añadiéndose las enzimas y eventuales ingredientes sensibles a temperatura adicionales tales como, por ejemplo, agentes de blanqueo, dado el caso más tarde por separado. Para la preparación de agentes de acuerdo con la invención con una elevada densidad aparente, en particular en el intervalo de 650 g/l a 950 g/l, se prefiere un procedimiento conocido por la patente europea EP 0 486 592 que presenta una etapa de extrusión. En la patente europea 0 642 576 está descrita otra preparación preferente con ayuda de un procedimiento de granulación.

30 Las proteínas se pueden emplear para agentes sólidos por ejemplo en forma secada, granulada, encapsulada o encapsulada y adicionalmente secada. Se pueden añadir por separado, es decir, como fase propia, o con otros constituyentes conjuntamente en la misma fase con o sin compactación. Si se deben procesar enzimas microencapsuladas en forma sólida, entonces se puede retirar el agua con procedimientos conocidos por el estado de la técnica de las soluciones acuosas que resultan de la preparación, tales como secado por pulverización, eliminación por centrifugado o mediante resolubilización. Las partículas obtenidas de este modo tienen habitualmente un tamaño de partícula entre 50 y 200 µm.

35 La forma encapsulada es razonable para proteger las enzimas frente a otros constituyentes tales como, por ejemplo, agentes de blanqueo, o para posibilitar una liberación controlada (controlled release). En función del tamaño de estas cápsulas se diferencia entre milicápsulas, microcápsulas y nanocápsulas, siendo particularmente preferentes las microcápsulas para enzimas. Otro procedimiento de encapsulación posible consiste en que las enzimas adecuadas para el uso en agentes de lavado o limpieza, partiendo de una mezcla de la solución enzimática con una solución o suspensión de almidón o un derivado de almidón, se encapsulan en almidón o el derivado de almidón.

40 Pueden estar presentes también unidas entre sí al menos dos fases sólidas. Así existe una posibilidad de poner a disposición un agente de acuerdo con la invención sólido al prensar o compactar hasta dar pastillas. Tales pastillas pueden ser mono- o polifásicas. De este modo, también esta forma de presentación ofrece la posibilidad de disponer un agente de acuerdo con la invención sólido con dos fases sólidas. Para la preparación de agentes de acuerdo con la invención en forma de pastilla que pueden ser monofásicos o multifásicos, de un color o varios colores y pueden estar compuestos en particular de una capa o de varias, preferentemente se procede de tal manera que se mezclan entre sí todos los constituyentes —dado el caso respectivamente de una capa— en una mezcladora y la mezcla se prensa mediante prensas convencionales para pastillas, por ejemplo, prensas excéntricas o prensas rotativas con fuerzas de prensado en el intervalo de aproximadamente 50 a 100 kN/cm², preferentemente de 60 a 70 kN/cm². En particular, con pastillas multicapa puede ser ventajoso que se preñe previamente al menos una capa. Esto se lleva a cabo preferentemente con fuerzas de prensado entre 5 y 20 kN/cm², en particular de 10 a 15 kN/cm².

Preferentemente, una pastilla preparada de este modo presenta un peso de 10 g a 50 g, en particular de 15 g a 40 g. La forma espacial de las pastillas es discrecional y puede ser redonda, oval o angulada, siendo posibles también formas intermedias.

5 Es particularmente ventajoso que en agentes polifásicos al menos una de las fases contenga un material sensible a amilasa, en particular almidón, o esté rodeada o revestida por el mismo al menos en parte. De este modo, esta fase se estabiliza mecánicamente y/o se protege frente a influencias desde el exterior y al mismo tiempo es atacada por una amilasa activa en el baño de lavado, de tal manera que se facilita la liberación de los ingredientes.

10 Los agentes de acuerdo con la invención asimismo preferentes están caracterizados porque en su totalidad están presentes de forma líquida, en forma de gel o pastosa. Las proteínas contenidas, preferentemente una proteína de acuerdo con la invención, se añaden a tales agentes preferentemente partiendo de una obtención de proteína llevada a cabo según el estado de la técnica y preparación en solución concentrada acuosa o no acuosa, por ejemplo, en forma líquida, por ejemplo, como solución, suspensión o emulsión, pero también en forma de gel o encapsulada o como polvo secado. Tales agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención en forma de soluciones en disolventes habituales se preparan por norma general mediante simple mezcla de los ingredientes que se pueden añadir a una mezcladora automática en sustancia o como solución.

15 Una forma de realización de la presente invención son los agentes líquidos, en forma de gel o pastosos a los que se ha añadido una proteína esencial para la invención y/o una de las otras proteínas contenidas y/o uno de los otros ingredientes contenidos de forma encapsulada, preferentemente en forma de microcápsulas. Entre las mismas son particularmente preferentes cápsulas de material sensible a amilasa. Un uso conjunto de este tipo de materiales sensibles a amilasa y la enzima amilolítica esencial para la invención en un agente de lavado o limpieza puede mostrar efectos de sinergia, por ejemplo, de tal manera que la enzima que escinde almidón respalda la escisión de las microcápsulas y, así, controla el proceso de liberación de los ingredientes encapsulados, de tal manera que su liberación no se realiza durante el almacenamiento y/o no al comienzo del procedimiento de limpieza, sino solo en un momento determinado. Sistemas complejos de agentes de lavado y limpieza con los más diversos ingredientes y los más diversos tipos de cápsulas se pueden basar en este mecanismo, representan formas de realización particularmente preferentes de la presente invención.

20 Se da un efecto comparable cuando los ingredientes del agente de lavado o limpieza se distribuyen en al menos dos fases diferentes, por ejemplo, dos o más fases sólidas unidas entre sí de un agente de lavado o de limpieza en forma de pastilla o distintos granulados en el interior del mismo agente en forma de polvo. Los detergentes bifásicos o polifásicos son estado de la técnica para la aplicación tanto en detergentes para el lavado a máquina de la vajilla como en agentes de lavado. La actividad de una enzima amilolítica en una fase activada antes es la condición para la activación de una fase más tardía cuando la misma está rodeada por una envoltura o un revestimiento sensible a amilasa o el material sensible a amilasa representa un constituyente integral de la fase sólida, durante cuya hidrólisis parcial o completa se desintegra la fase correspondiente. Por tanto, el empleo de la enzima esencial para la invención para este fin representa una forma de realización preferente de la presente invención.

30 Los ingredientes de agentes de lavado y limpieza pueden respaldarse de manera adecuada mutuamente en su rendimiento. El uso sinérgico de amilasa e inhibidores de transferencia de color para aumentar el poder de limpieza se desvela, por ejemplo, con la solicitud WO 99/63035. También es sabido que los polímeros que se pueden emplear al mismo tiempo como cosoporte tales como, por ejemplo, alquil-poli-glucósidos, pueden estabilizar y aumentar la actividad y la estabilidad de enzimas contenidas, así por la solicitud WO 98/45396. Así se prefiere que una variante de α -amilasa de acuerdo con la invención se modifique por uno de los otros constituyentes que se han indicado anteriormente, en particular se establezca y/o se aumente en su contribución al poder de lavado o de limpieza del agente. Por tanto, las formulaciones ajustadas correspondientemente para agentes de acuerdo con la invención representan formas de realización particularmente preferentes de la presente invención.

35 En el marco de agentes correspondientes, las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención pueden servir para la activación de fases propias o de otras fases cuando se facilitan en solitario o junto con al menos otro principio activo con actividad de limpieza o que respalda el efecto de limpieza en un agente de lavado o de limpieza que consiste en más de una fase. De forma correspondiente también pueden servir para liberar ingredientes de cápsulas cuando se facilitan ellos u otro principio activo en un agente de lavado o de limpieza en forma encapsulada.

40 Otro objeto de la invención lo representan procedimientos para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras que están caracterizados porque en al menos una de las etapas del procedimiento se activa una variante de α -amilasa de acuerdo con la invención que se ha descrito anteriormente.

45 De hecho, en esta forma de realización, la invención se realiza por el hecho de que las propiedades enzimáticas mejoradas de acuerdo con la invención, en particular, la mayor estabilidad frente a multimerización, en principio favorece a cualquier procedimiento de limpieza, por ejemplo, debido a que incluso durante la aplicación se pierde menos enzima por agregación. Cada procedimiento de limpieza se enriquece en la correspondiente actividad cuando se añade en al menos una etapa del procedimiento. Tales procedimientos se realizan, por ejemplo, con máquinas tales como lavavajillas domésticos o lavadoras domésticas habituales. Se prefieren correspondientemente los procedimientos preferentes de acuerdo con las indicaciones que se han efectuado anteriormente.

Además se prefieren tales procedimientos que están caracterizados porque se emplea la variante de α -amilasa a través de un agente de acuerdo con la invención que se ha descrito anteriormente.

5 En particular se prefiere cualquier procedimiento que esté caracterizado porque la α -amilasa se emplea en la correspondiente etapa de procedimiento en una cantidad de 0,01 mg a 400 mg por etapa de procedimiento correspondiente, preferentemente de 0,02 mg a 300 mg, de forma particularmente preferente de 0,03 mg a 100 mg.

En caso adecuado resultan a este respecto valores de concentración de 0,0005 a 20 mg por l, preferentemente de 0,005 a 10 mg por l, de forma particularmente preferente de 0,005 a 8 mg de la proteína amilolítica por l de baño de lavado. Se puede determinar la concentración de proteína con ayuda de procedimientos conocidos, por ejemplo, los procedimientos de BCA o biuret que se han mencionado anteriormente.

10 De forma correspondiente a las anteriores realizaciones se realiza la presente invención también mediante el uso de variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención. De hecho, también aquí se llevan a efecto las propiedades favorables de las enzimas correspondientes. Las mismas se aplican en particular para fines de limpieza.

15 Por tanto, el uso de una de las variantes de α -amilasa de acuerdo con la invención que se han descrito anteriormente para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras representa un objeto de la invención propio.

A este respecto se puede emplear como único componente eficaz. Preferentemente, esto tiene lugar junto con al menos otro principio activo con actividad de limpieza o que respalda el efecto de limpieza.

Por tanto, se prefiere un uso que esté caracterizado porque la variante de α -amilasa se emplea a través de un agente de acuerdo con la invención que se ha descrito anteriormente.

20 De forma adecuada, un uso de este tipo está caracterizado porque por aplicación, preferentemente por aplicación en un lavavajillas o en una lavadora, se emplean de 0,01 mg a 400 mg de la variante de α -amilasa, preferentemente de 0,02 mg a 300 mg, de forma particularmente preferente de 0,03 a 100 mg.

25 De hecho, por esto en el baño de lavado se dan de forma adecuada los valores de concentración que se han indicado anteriormente. Esta dosificación se puede efectuar, en función del problema de limpieza, por parte del fabricante del agente o por el consumidor final.

El uso de una variante de α -amilasa de acuerdo con la invención para el tratamiento de materias primas o productos intermedios en la fabricación de materiales textiles, en particular, para el desaprestado de algodón, representa otra forma de realización de la invención.

30 Los materiales en bruto y productos intermedios de la producción de materiales textiles, por ejemplo, para aquellos a base de algodón, se acaban en el marco de su producción y procesamiento posterior con almidón para posibilitar un mejor procesamiento. Este procedimiento aplicado a hilos, a productos intermedios al igual que a materiales textiles se denomina aprestado (*sizing*). Para la retirada del apresto, es decir, la capa de protección que contiene almidón (desaprestado, *desizing*) son adecuadas proteínas amilolíticas de acuerdo con la invención y, de hecho, en particular debido a que están estabilizadas durante la acción en un medio líquido contra multimerización.

35 Los siguientes ejemplos explican adicionalmente la presente invención.

Ejemplos

40 Todas las etapas de trabajo de biología molecular siguen procedimientos convencionales, tal como están indicados, por ejemplo, en el manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, u obras pertinentes comparables. Las enzimas, cajas modulares (kits) y aparatos se emplean según las indicaciones de los respectivos fabricantes.

Ejemplo 1

Cultivo de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368)

45 El microorganismo *Bacillus* sp. A 7-7 está depositado con el número de depósito DSM 12368 en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, 38124 Braunschweig (<http://www.dsmz.de>). Se describe en la solicitud WO 02/10356 A2. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de la α -amilasa formada por esta especie (depositada) se diferencian en las siguientes dos posiciones de las secuencias que están representadas en el protocolo de secuencias del documento WO 02/10356 A2: el correspondiente ADN dispone en las posiciones de ácido nucleico 805-807 de acuerdo con la SEC ID N.º 1 de la presente solicitud del triple gat que codifica el aminoácido D (en la posición de aminoácido 236) y en las posiciones 1156-1158, del triplete tat que codifica el aminoácido Y (en la posición 353). (En la SEC ID N.º 1 o 2 del documento WO 02/10356 A2 están indicados en los puntos correspondientes los tripletes ggt para G o tgt para C).

50

A través de procedimientos conocidos en general para la mutagénesis puntual, por ejemplo, con ayuda del kit QuickChange® de la empresa Stratagene, La Jolla, EEUU (véase más adelante) y mediante cebadores derivados de la SEC ID N.º 1 es posible convertir esta α -amilasa en otra.

- 5 En el documento WO 02/10356 A2 se describe el cultivo de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368). Un medio adecuado es medio YPSS, que contiene almidón soluble 15 g/l, extracto de levadura 4 g/l, K_2HPO_4 1 g/l y $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,5 g/l, ajustándose el valor de pH después del tratamiento con autoclave con solución al 20 % de carbonato sódico a 10,3. A partir de esto se puede obtener la correspondiente α -amilasa, tal como está representado en el documento WO 02/10356 A2. Por tanto, esta α -amilasa y las variantes derivadas de la misma se pueden preparar a través de procedimientos conocidos en general al menos a escala de laboratorio.

10 Ejemplo 2

Modelado de homología y selección de aminoácidos sustituibles de acuerdo con la invención

Modelado de homología

- 15 El modelado de homología se llevó a cabo para la α -amilasa de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) como se representa en la descripción a través del banco de datos de proteína RSCB (accesible a través del Centro Max-Delbrück en Berlín, Alemania). A este respecto, en la búsqueda con la secuencia de proteína se hallaron las siguientes estructuras: la α -amilasa de *B. licheniformis* (entrada en banco de datos RCSB-PDB: 1 BLI), una α -amilasa quimérica de las de *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* en estructura nativa (1E3X, 1 E43), un complejo de acarboxa de la misma α -amilasa quimérica (1E3Z), un complejo de tris/maltotriosa de la misma α -amilasa quimérica (1E40) y una variante estabilizada cinéticamente de la α -amilasa de *B. licheniformis* (10B0).

- 20 Mediante superposición (superimposición) de estas estructuras en el SwissPDB-viewer se creó una estructura guía sobre la que se modeló después la secuencia de proteína de ALBA. A continuación se corrigió la orientación de las cadenas laterales en la estructura ALBA y se llevó a cabo una minimización de energía. Las etapas individuales se pueden obtener del manual de usuario mencionado y se realizaron de acuerdo con los ajustes convencionales del programa.

- 25 En total, en la superficie de molécula que comprende 484 aminoácidos se encuentran los siguientes 407 aminoácidos (se definen como tales a través de una accesibilidad de al menos 1; en cuanto a la accesibilidad: véase la descripción y la siguiente sección):

- 30 T5, N6, G7, T8, M9, Q11, Y12, E14, W15, Y16, L17, P18, N19, D20, G21, N22, H23, W24, N25, R26, R28, S29, D30, A31, S32, N33, K35, D36, K37, G38, I39, T40, A41, W43, P46, A47, W48, K49, G50, A51, S52, Q53, N54, D55, V56, G57, Y58, G59, A60, Y61, D62, L63, Y64, L66, G67, E68, F69, N70, Q71, K72, G73, T74, V75, R76, T77, K78, Y79, G80, T81, R82, N83, Q84, L85, Q86, A87, V89, T90, A91, K93, S94, N95, G96, Q98, V99, Y100, V103, M105, N106, H107, K108, G110, A111, D112, A113, T114, E115, W116, V117, R118, V120, E121, V122, N123, P124, S125, N126, R127, N128, Q129, E130, V131, S132, G133, D134, Y135, T136, I137, E138, W140, K142, F143, D144, F145, P146, G147, R148, G149, N150, T151, H152, S153, N154, F155, K156, W157, R158, W159, Y160, H161, D166, W167, D168, Q169, S170, R171, Q172, L173, Q174, N175, R176, I177, Y178, K179, R181, G182, D183, G184, K185, G186, W187, W189, E190, V191, D192, T193, E194, N195, G196, N197, Y198, D199, Y200, L201, M202, Y203, I206, D207, M208, D209, H210, P211, E212, V214, N215, E216, L217, R218, N219, V222, W223, T225, N226, T227, L228, G229, L230, D231, F233, R234, I235, G236, A237, K239, H240, 1241, K242, Y243, S244, F245, T246, R247, D248, W249, L250, T251, H252, V253, R254, N255, T256, T257, G258, K259, N260, M261, F262, A263, E266, F267, W268, K269, N270, D271, I272, G273, A274, I275, E276, N277, S280, K281, N283, W284, N285, H286, S287, V288, F289, P292, L293, Y295, N296, L297, Y298, N299, S301, R302, S303, G304, G305, N306, Y307, D308, M309, R310, Q311, I312, F313, N314, G315, V318, Q319, R320, H321, P322, T323, H324, T327, F328, V329, D330, N331, H332, D333, Q335, P336, E337, E338, A339, L340, E341, S342, F343, E345, E346, W347, F348, K349, P350, L351, C353, L355, T356, L357, R359, D360, 45 Q361, G362, Y363, S365, V366, F367, Y368, D370, Y371, Y372, G373, I374, P375, T376, H377, G378, P380, A381, M382, K383, S384, K385, I386, D387, P388, L390, E391, R393, Q394, K395, Y396, Y398, G399, K400, Q401, N402, D403, Y404, L405, D406, H407, H408, N409, M410, R415, E416, G417, N418, T419, A420, H421, P422, N423, S424, M430, D432, G433, P434, G435, G436, N437, K438, W439, Y441, G443, R444, N445, K446, A447, G448, Q449, V450, W451, R452, D453, I454, T455, G456, N457, R458, S459, G460, T461, V462, T463, 50 I464, N465, A466, D467, W469, N471, S473, V474, N475, G476, G477, S478, V479, V483, N484, N485.

Cálculo de los restos de aminoácido de superficie con una contribución al potencial electrostático de toda la molécula

- 55 Al establecimiento de la estructura tridimensional le siguió un cálculo de las respectivas contribuciones de los aminoácidos situados en la superficie para el potencial electrostático de toda la molécula. También este cálculo se realizó como se representa en la descripción con la correspondiente función del SwissPDB-viewer mencionado con parámetros convencionales. Tales contribuciones se ejercen por restos de aminoácido tanto neutros como de carga negativa al igual como por aquellos que por sí mismos son neutros, pero cubren una carga situada más en el interior

de la molécula. Por tanto, se trata de una proyección de las cargas sobre la superficie de la molécula.

En la Figura 1 se muestra el resultado de esto: allí se reconoce la representación tridimensional de la superficie de Conolly del α -amilasa de *Bacillus* sp A 7-7 (DSM 12368), estando resaltada la distribución de carga y polaridad con color (blanco, gris y negro). En total, los siguientes 118 restos de aminoácido de la molécula de α -amilasa de *Bacillus* sp A 7-7 (DSM 12368) realizan una contribución positiva o neutra al potencial electrostático de la superficie:

T5, N6, G7, T8, N19, G21, N22, H23, N25, R26, R28, S29, A31, S32, N33, K35, K37, G38, K49, Q53, L66, K72, T74, V75, R76, K78, T81, R82, N83, Q84, L85, Q86, A87, V89, T90, A91, K93, S94, N95, G96, Q98, K108, R118, T136, K142, G149, N150, T151, H152, N154, K156, R158, Y160, H161, R171, Q172, R176, R181, R218, T227, L228, G229, K242, R247, T251, R254, K259, N260, K281, N283, R302, R310, R320, T323, R359, Y368, Y372, T376, K383, K385, R393, Q394, K395, Y398, G399, K400, Y404, M410, R415, G417, N418, T419, A420, H421, P422, G435, G436, K438, W439, R444, N445, K446, Q449, V450, R452, R458, S459, G460, T461, V462, T463, N465, A466, N471, S473, N475, G476, N484.

Cálculo de la susceptibilidad de disolvente (accesibilidad)

Basándose en estos resultados se llevó a cabo ahora el cálculo de la susceptibilidad de disolvente (accesibilidad) de los restos de aminoácido que se encuentran en la superficie que se han descrito anteriormente, que realizan una contribución positiva o neutra a la carga o polaridad de toda la molécula. Para esto, a su vez se empleó el SwissPdb-viewer que ya se ha mencionado, conservando los parámetros convencionales del programa. Por ello se establecieron los siguientes restos de aminoácido, estando indicados los valores para la accesibilidad de disolvente respectivamente en % entre paréntesis detrás de las posiciones mencionadas:

T5 (39), N6 (12), G7 (13), N19 (28), N22 (28), N25 (16), R26 (27), R28 (39), S29 (38), S32 (28), N33 (28), K35 (37), K37 (18), Q53 (12), K72 (27), V75 (30), R76 (24), T81 (16), R82 (22), N83 (44), Q84 (24), Q86 (18), A87 (18), T90 (30), A91 (11), K93 (32), S94 (50), N95 (19), G96 (25), Q98 (29), R118 (41), T136 (22), K142 (30), G149 (14), N150 (39), T151 (22), H152 (27), N154 (41), K156 (30), R158 (33), Y160 (20), R171 (32), Q172 (53), R176 (41), R181 (34), R218 (18), T227 (19), G229 (14), K242 (15), R247 (20), T251 (23), R254 (15), K259 (26), N260 (49), K281 (33), N283 (40), R302 (50), R310 (31), R320 (52), T323 (49), R359 (13), Y368 (12), Y372 (37), T376 (56), K383 (19), K385 (37), Q394 (20), K395 (38), G399 (16), K400 (44), Y404 (11), G417 (11), N418 (25), T419 (59), A420 (37), H421 (16), P422 (46), G435 (25), G436 (17), W439 (47), R444 (49), N445 (41), Q449 (31), V450 (24), R452 (33), R458 (24), S459 (52), G460 (32), T461 (35), T463 (40), N465 (22), A466 (37), N471 (20), S473 (10), N475 (25), G476 (31), N484 (12).

Por tanto, estos son los 97 restos de aminoácido de la molécula de α -amilasa que comprende en total 484 aminoácidos de *Bacillus* sp A 7-7 (DSM 12368), que realizan una contribución positiva o neutra al potencial electrostático de la superficie y presentan adicionalmente una accesibilidad de al menos el 10 %.

Los demás 21 aminoácidos de superficie que se habían establecido previamente como aquellos con una contribución neutra o positiva, pero que poseen una accesibilidad menor del 10 %, son los siguientes, estando indicado el correspondiente valor a su vez entre paréntesis:

T8 (2), G21 (4), H23 (2), A31 (2), G38 (6), K49 (2), L66 (2), T74 (6), K78 (6), L85 (2), V89 (1), K108 (9), H161 (1), L228 (1), R393 (5), Y398 (4), M410 (3), R415 (6), K438 (7), K446 (5), V462 (5).

Agrupación de los restos de aminoácido cargados de forma neutra o positiva o polarizados y particularmente accesibles para el disolvente

Los 97 restos identificados con una accesibilidad de al menos el 10 % se pueden asignar según su ubicación en la superficie de esta α -amilasa a distintos grupos, representando las zonas relacionadas respectivamente con los grupos A y B la polaridad o carga neutra o positiva. El siguiente Grupo A comprende los 63 restos de aminoácido entre los mismos que forman una superficie relacionada con potencial electrostático neutro o positivo (a su vez, entre paréntesis la accesibilidad determinada previamente):

A) T5 (39), N6 (12), G7 (13), N19 (28), N22 (28), N25 (16), R26 (27), R28 (39), S29 (38), S32 (28), N33 (28), K35 (37), K37 (18), Q53 (12), K72 (27), V75 (30), R76 (24), T81 (16), R82 (22), N83 (44), Q84 (24), Q86 (18), A87 (18), T90 (30), A91 (11), K93 (32), S94 (50), N95 (19), G96 (25), Q98 (29), R118 (41), T136 (22), K142 (30), G149 (14), N150 (39), T151 (22), H152 (27), N154 (41), K156 (30), R158 (33), Y160 (20), R171 (32), Q172 (53), R181 (34), T227 (19), G229 (14), R247 (20), T251 (23), R254 (15), K259 (26), N260 (49), K281 (33), N283 (40), Q394 (20), K395 (38), G399 (16), K400 (44), G417 (11), N418 (25), T419 (59), A420 (37), H421 (16), P422 (46).

El siguiente Grupo B comprende los 20 restos de aminoácido que forman una segunda superficie relacionada con potencial electrostático neutro o positivo:

(B) G435 (25), G436 (17), W439 (47), R444 (49), N445 (41), Q449 (31), V450 (24), R452 (33), R458 (24), S459 (52), G460 (32), T461 (35), T463 (40), N465 (22), A466 (37), N471 (20), S473 (10), N475 (25), G476 (31), N484 (12).

ES 2 562 663 T3

El siguiente Grupo C comprende los 14 restos de aminoácido restantes que no se pueden asignar a ninguna de estas dos superficies de mayor tamaño, sino que aparecen de manera aislada:

(C) R176 (41), R218 (18), K242 (15), R302 (50), R310 (31), R320 (52), T323 (49), R359 (13), Y368 (12), Y372 (37), T376 (56), K383 (19), K385 (37), Y404 (11).

- 5 En particular de los aminoácidos que pertenecen a los Grupos A y B se puede asumir que sus contribuciones a una carga de superficie relacionada contribuyen a la tendencia observada a di- y/o multimerización mediada por carga y/o polaridad y, por tanto, a la agregación.

Ejemplo 3

Mutagénesis dirigida

- 10 Las posiciones establecidas en el anterior ejemplo sirven para la α -amilasa de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) como punto de partida para mutaciones puntuales a través de mutagénesis dirigida, es decir, para la introducción de otro aminoácido para la correspondiente posición o posiciones. Se lleva a cabo, por ejemplo, con ayuda del kit QuikChange (empresa Stratagene, n.º de cat. 200518) según el protocolo correspondiente. Los cebadores se pueden diseñar mediante las secuencias de ADN y aminoácidos indicadas en la SEC ID N.º: 1, modificándose el
- 15 respectivo codón de manera correspondiente al aminoácido que se debe introducir. En este caso, para la generación de una polaridad o carga menos neutra o positiva, es decir, para la introducción de una polaridad o carga más bien negativa, son posibles las siguientes sustituciones de aminoácidos:

Aminoácido de partida	por
Arg (R)	K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Lys (K)	Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Tyr (Y)	C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Cys (C)	H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
His (H)	G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Gly (G)	A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ala (A)	V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Val (V)	L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Leu (L)	I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ile (I)	M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Met (M)	F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Phe (F)	W, P, S, T, N, Q, E o D
Trp (W)	P, S, T, N, Q, E o D
Pro (P)	S, T, N, Q, E o D
Ser (S)	T, N, Q, E o D
Thr (T)	N, Q, E o D
Asn (N)	Q, E o D
Gln (Q)	E o D
Glu (E)	D

- 20 Para esto, por tanto, el codón en la secuencia génica de la correspondiente α -amilasa se sustituye por un codón del aminoácido que se debe introducir. Según este principio de manera adecuada se mutageniza correspondientemente un vector de expresión que contiene la secuencia de α -amilasa y según procedimientos conocidos en general se introduce mediante transformación en una cepa de expresión, en el presente ejemplo en *B. subtilis*.

Ejemplo 4**Obtención y purificación de las mutantes de amilasa**

5 El cultivo de cepas de *B. subtilis* positivas a amilasa se realiza en el medio YPSS mencionado en el Ejemplo 1. Esta forma de proceder así como la purificación de la enzima formada por estas cepas se realiza de acuerdo con la descripción en el documento WO 02/103562 A2. A partir de esto se obtiene también la determinación de la actividad amilolítica de la enzima purificada de acuerdo con el denominado procedimiento DNS. A continuación, la actividad que se puede determinar de este modo sirve como parámetro para la estabilidad de la enzima en condiciones respectivamente distintas.

Determinación de la formación de agregados

10 La formación de multímeros y la precipitación se comprobaron mediante el enturbiamiento de una solución que contiene amilasa con un contenido de amilasa de al menos 5 mg/ml mediante espectrometría con una longitud de onda de 600 nm. Los mutantes de acuerdo con la invención muestran una menor tendencia a la formación de precipitado después de incubación de 16 horas en la concentración de al menos 5 mg/ml de proteína en tampón o medio de cultivo a 25 °C, que se manifiesta en un menor aumento de la absorción a 600 nm.

15 Descripción de las figuras

Figura 1: representación de la distribución de carga y polaridad en la superficie de Conolly de la α -amilasa de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368).

La representación se creó con ayuda del Swiss-Pdb-viewer (Swiss Institute of Bioinformatics; <http://us.expasy.org/spdbv/>; detalles: véase texto).

20 Codificación de color:

gris: carga o polarización negativa

blanco: carga o polarización neutra

negro: carga o polarización positiva

La superficie posterior de la molécula que no se puede ver en esta representación, que contiene también el centro activo, presenta de forma continua un patrón de carga negativa.

25 Figura 2: alineamiento de la α -amilasa de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368; SEC ID N.º 2) con las otras α -amilasas más importantes del estado de la técnica, respectivamente a lo largo de la zona de la proteína madura, es decir, en las posiciones 32 a 516 de acuerdo con la SEC ID N.º 2.

El recuento individual se puede seguir mediante el número de posición indicado al comienzo de cada línea detrás del respectivo nombre para el primer aminoácido mostrado en cada caso:

Allí significan:

A 7-7: α -amilasa de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368; SEC ID N.º 2)

S707: α -amilasa de *Bacillus* sp. n.º 707

LAMY: α -amilasa de *Bacillus* sp. KSM-AP1378

BAA: α -amilasa de *B. amyloliquefaciens*

BLA: α -amilasa de *B. licheniformis*

BStA: α -amilasa de *B. stearothermophilus*

MK716: α -amilasa de *Bacillus* sp. MK716

TS-23: α -amilasa de *Bacillus* sp. TS-23

K38: α -amilasa de *Bacillus* KSM-K38

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien

35 <120> Variantes de alfa-amilasa estabilizadas frente a di- y/o multimerización, procedimiento para su producción así como agentes de lavado y de limpieza con estas variantes de alfa-amilasa

ES 2 562 663 T3

<130> H 06466 PCT
 <150> DE102004047776.0
 5 <151> 01-10-2004
 <160> 2
 <170> PatentIn versión 3.1
 10 <210> 1
 <211> 1554
 <212> ADN
 <213> *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368)
 15 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1554)
 <223> Alfa-Amilasa
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1551)
 <223>
 25 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (100)..()
 <223>
 30 <400> 1

```

atg acg atg aga aaa cgt aaa aat gga tta atc agt att cta ttg gca      48
Met Thr Met Arg Lys Arg Lys Asn Gly Leu Ile Ser Ile Leu Leu Ala
                -30                -25                -20

ttt ttg ttg gta ctt aca tca ata cct ttt act tca gca aac gta gaa      96
Phe Leu Leu Val Leu Thr Ser Ile Pro Phe Thr Ser Ala Asn Val Glu
                -15                -10                -5

gca cac cat aat ggc aca aat gga aca atg atg caa tat ttt gaa tgg      144
Ala His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
-1 1                5                10                15

tat ttg cca aat gac ggt aat cat tgg aat aga tta aga tca gat gca      192
Tyr Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala
                20                25                30

agt aat ctt aaa gat aaa ggg att aca gcg gtt tgg att cca cct gct      240
Ser Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala
    
```

ES 2 562 663 T3

	35		40		45																
tgg	aaa	ggg	gct	tct	caa	aat	gat	gta	ggg	tat	gga	gcc	tat	gat	ctg						288
Trp	Lys	Gly	Ala	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu						
	50						55					60									
tat	gat	tta	gga	gaa	ttc	aat	caa	aaa	gga	acc	gta	cgt	aca	aag	tac						336
Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr						
	65					70					75										
gga	acc	cgt	aat	caa	tta	caa	gct	gca	gta	acc	gcc	tta	aaa	agt	aat						384
Gly	Thr	Arg	Asn	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Ser	Asn						
	80			85						90					95						
ggt	att	caa	gta	tac	gga	gat	gtc	gta	atg	aat	cat	aag	ggt	gga	gcg						432
Gly	Ile	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala						
				100					105					110							
gat	gcc	act	gag	tgg	ggt	cga	gcg	ggt	gaa	gtg	aac	cca	agt	aat	cgt						480
Asp	Ala	Thr	Glu	Trp	Val	Arg	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asn	Arg						
			115					120					125								
aat	caa	gaa	gtc	tct	ggt	gat	tat	acg	att	gag	gct	tgg	act	aag	ttt						528
Asn	Gln	Glu	Val	Ser	Gly	Asp	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe						
		130					135					140									
gat	ttt	cct	ggt	cga	ggt	aat	acc	cac	tct	aac	ttt	aaa	tgg	aga	tgg						576
Asp	Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	His	Ser	Asn	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp						
	145					150					155										
tat	cat	ttc	gat	ggt	gta	gat	tgg	gat	cag	tca	cgt	caa	ttg	cag	aat						624
Tyr	His	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Gln	Ser	Arg	Gln	Leu	Gln	Asn						
	160				165					170					175						
cga	atc	tat	aaa	ttc	aga	gga	gat	gga	aaa	ggt	tgg	gac	tgg	gaa	gtt						672
Arg	Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly	Trp	Asp	Trp	Glu	Val						
				180					185					190							
gat	aca	gag	aac	gga	aac	tat	gac	tat	cta	atg	tac	gcg	gat	att	gat						720
Asp	Thr	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp						
			195					200					205								
atg	gat	cac	cct	gaa	gta	gtg	aat	gaa	ctc	aga	aac	tgg	ggt	gta	tgg						768
Met	Asp	His	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Asn	Trp	Gly	Val	Trp						
		210					215						220								
tat	acc	aat	aca	ctg	ggg	cta	gac	ggg	ttc	aga	ata	gat	gcg	gta	aaa						816
Tyr	Thr	Asn	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys						
	225						230				235										
cat	ata	aaa	tat	agc	ttt	act	cgt	gat	tgg	ctt	act	cac	gtt	aga	aat						864
His	Ile	Lys	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Leu	Thr	His	Val	Arg	Asn						
	240				245					250					255						
acg	aca	ggt	aaa	aat	atg	ttt	gca	gtt	gca	gag	ttc	tgg	aag	aat	gac						912
Thr	Thr	Gly	Lys	Asn	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp						
				260					265					270							
ata	ggt	gca	att	gaa	aat	tac	tta	agt	aaa	aca	aat	tgg	aat	cat	tca						960

Ile Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Ser Lys Thr Asn Trp Asn His Ser	275	280	285	
ggt ttt gat gtg ccc ctg cat tat aac ctt tat aat gca tcg aga agt				1008
Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Arg Ser	290	295	300	
ggt ggc aat tat gat atg agg caa ata ttt aat gga aca gtt gtt cag				1056
Gly Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln	305	310	315	
aga cat cct aca cat gct gta aca ttt gtt gat aac cat gat tca cag				1104
Arg His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln	320	325	330	335
ccg gaa gaa gcc cta gag tca ttt gtt gaa gag tgg ttc aaa ccg tta				1152
Pro Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu	340	345	350	
gcg tat gct ctc aca cta aca cgt gat caa gga tat cct tcc gtt ttt				1200
Ala Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Asp Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe	355	360	365	
tat gga gat tat tat ggg att ccg acg cat ggt gta cca gca atg aaa				1248
Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys	370	375	380	
tct aag att gat ccg att tta gaa gca cgt caa aag tat gcg tac gga				1296
Ser Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly	385	390	395	
aaa caa aat gat tat ttg gat cac cat aat atg att ggc tgg acg cgt				1344
Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Met Ile Gly Trp Thr Arg	400	405	410	415
gaa ggt aat aca gca cat ccc aac tca gga cta gca act att atg tcg				1392
Glu Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser	420	425	430	
gat ggc cca gga gga aat aaa tgg atg tat gtt ggg cgt aat aag gct				1440
Asp Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Asn Lys Ala	435	440	445	
gga caa gtt tgg aga gat att aca gga aat cgc tca ggt acg gtg acg				1488
Gly Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr	450	455	460	
att aac gca gat ggg tgg ggt aat ttt tct gta aat ggt ggg tct gta				1536
Ile Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val	465	470	475	
tct ata tgg gta aat aat				1554
Ser Ile Trp Val Asn	480			

<210> 2
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368)

5

<400> 2

ES 2 562 663 T3

Met Thr Met Arg Lys Arg Lys Asn Gly Leu Ile Ser Ile Leu Leu Ala
 -30 -25 -20

Phe Leu Leu Val Leu Thr Ser Ile Pro Phe Thr Ser Ala Asn Val Glu
 -15 -10 -5

Ala His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
 -1 1 5 10 15

Tyr Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala
 20 25 30

Ser Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala
 35 40 45

Trp Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu
 50 55 60

Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr
 65 70 75

Gly Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ala Leu Lys Ser Asn
 80 85 90 95

Gly Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala
 100 105 110

Asp Ala Thr Glu Trp Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg
 115 120 125

Asn Gln Glu Val Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe
 130 135 140

Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp
 145 150 155

Tyr His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn
 160 165 170 175

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

Asp Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp
 195 200 205
 Met Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp
 210 215 220
 Tyr Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys
 225 230 235
 His Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn
 240 245 250 255
 Thr Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp
 260 265 270
 Ile Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Ser Lys Thr Asn Trp Asn His Ser
 275 280 285
 Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Arg Ser
 290 295 300
 Gly Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln
 305 310 315
 Arg His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln
 320 325 330 335
 Pro Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu
 340 345 350
 Ala Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Asp Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe
 355 360 365
 Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys
 370 375 380
 Ser Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly
 385 390 395
 Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Met Ile Gly Trp Thr Arg
 400 405 410 415
 Glu Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser
 420 425 430

ES 2 562 663 T3

Asp Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Asn Lys Ala
435 440 445

Gly Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr
450 455 460

Ile Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val
465 470 475

Ser Ile Trp Val Asn
480

REIVINDICACIONES

1. Variante de α -amilasa con al menos una sustitución de aminoácido con respecto a la molécula de partida, en la que en el caso de la sustitución de aminoácido un resto de aminoácido de la molécula de partida situado sobre la superficie de la molécula y que ejerce una contribución neutra o de polaridad positiva o de carga positiva al potencial electrostático de la molécula se ha sustituido con un resto de aminoácido más negativamente polar o más negativamente cargado, siendo posibles las siguientes sustituciones de aminoácido:

Aminoácido de partida	por
Arg (R)	K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Lys (K)	Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Tyr (Y)	C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Cys (C)	H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
His (H)	G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Gly (G)	A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ala (A)	V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Val (V)	L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Leu (L)	I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ile (I)	M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Met (M)	F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Phe (F)	W, P, S, T, N, Q, E o D
Trp (W)	P, S, T, N, Q, E o D
Pro (P)	S, T, N, Q, E o D
Ser (S)	T, N, Q, E o D
Thr (T)	N, Q, E o D
Asn (N)	Q, E o D
Gln (Q)	E o D
Glu (E)	D

y encontrándose el resto de aminoácido mencionado en una posición que pertenece a uno de los dos siguientes grupos:

- 10 (A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422; o
(B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484,

- 15 en cada caso indicados en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2, tratándose en el caso de la molécula de partida de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en un 100 % a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N.º 2 en las posiciones +1 a 484.

- 20 2. Variante de α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el resto de aminoácido mencionado antes de la sustitución de aminoácido presenta una accesibilidad de al menos un 10 %, preferentemente de al menos un 20 %, de manera especialmente preferente de al menos un 30 %, calculándose la accesibilidad del resto de aminoácido en cuestión sobre una escala del 0 % al 100 %, significando un valor del 0 % de accesibilidad que el resto en cuestión no es accesible para el disolvente, y el 100 % representa la accesibilidad posible en un pentapéptido hipotético GGXGG.

- 25 3. Variante de α -amilasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, encontrándose el resto de aminoácido mencionado en una zona neutra o positivamente polarizada o cargada de al menos dos restos de aminoácido directamente adyacentes sobre la superficie.

4. Variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que se han realizado varias de las sustituciones de aminoácido mencionadas, preferentemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, de manera especialmente preferente entre 10 y 30 y de manera muy especialmente preferente entre 15 y 25.

- 30 5. Variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que para la reducción de la variación de carga total en al menos una a como máximo exactamente tantas otras posiciones como las del grupo (A) o (B) se ha sustituido o se han sustituido uno o varios restos de aminoácido de la molécula de partida situados sobre la superficie de la molécula con restos de aminoácido menos negativamente polares o menos negativamente cargados, siendo posibles en cada caso las siguientes sustituciones de aminoácido:

35

Aminoácido de partida	por
K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Arg (R)
Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Lys (K)
C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Tyr (Y)
H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Cys (C)
G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	His (H)
A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Gly (G)
V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Ala (A)
L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Val (V)
I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Leu (L)
M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Ile (I)
F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Met (M)
W, P, S, T, N, Q, E o D	Phe (F)
P, S, T, N, Q, E o D	Trp (W)
S, T, N, Q, E o D	Pro (P)
T, N, Q, E o D	Ser (S)
N, Q, E o D	Thr (T)
Q, E o D	Asn (N)
E o D	Gln (Q)
D	Glu (E)

6. Variante de α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la sustitución o las sustituciones realizadas para la reducción de la variación de carga total se ha realizado o se han realizado en una posición o en posiciones de aminoácido que no pertenece o no pertenecen a las siguientes:

- (A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422 o
- (B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484 o
- (C) 176, 218, 242, 302, 310, 320, 323, 359, 368, 372, 376, 383, 385 y 404,

en cada caso indicadas en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.

7. Variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que en el caso de la molécula de partida se trata de una variante de α -amilasa con, con preferencia creciente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones puntuales adicionales.

8. Variante de α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 7 con las mutaciones puntuales adicionales en una o varias de las siguientes posiciones: 5, 167, 170, 177, 202, 204, 271, 330, 377, 385 y 445, en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.

9. Variante de α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 8, en la que se trata de las siguientes mutaciones puntuales: 5A, 167R, 170P, 177L, 202L, 204V, 271D, 330D, 377R, 385S y/o 445Q.

10. Procedimiento para aumentar la estabilidad de una α -amilasa de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) frente a una dimerización y/o multimerización mediada por interacciones electrostáticas, mediante lo cual al menos un resto de aminoácido de la molécula de partida situado sobre la superficie de la molécula y que ejerce una contribución neutra o de polaridad positiva o de carga positiva al potencial electrostático de la molécula se ha sustituido con un resto de aminoácido más negativamente polar o más negativamente cargado, siendo posibles las siguientes sustituciones de aminoácido:

aminoácido de partida	por
Arg (R)	K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Lys (K)	Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Tyr (Y)	C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Cys (C)	H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
His (H)	G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Gly (G)	A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ala (A)	V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Val (V)	L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Leu (L)	I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Ile (I)	M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D
Met (M)	F, W, P, S, T, N, Q, E o D

(continuación)

aminoácido de partida	por
Phe (F)	W, P, S, T, N, Q, E o D
Trp (W)	P, S, T, N, Q, E o D
Pro (P)	S, T, N, Q, E o D
Ser (S)	T, N, Q, E o D
Thr (T)	N, Q, E o D
Asn (N)	Q, E o D
Gln (Q)	E o D
Glu (E)	D

y encontrándose el resto de aminoácido mencionado en una posición que pertenece a uno de los dos siguientes grupos:

- 5 (A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422; o
(B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484,

- 10 en cada caso indicados en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2, tratándose en el caso de la molécula de partida de la α -amilasa de *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368), cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en un 100 % a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N.º 2 en las posiciones +1 a 484.

- 15 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el resto de aminoácido mencionado antes de la sustitución de aminoácido presenta una accesibilidad de al menos un 10 %, preferentemente de al menos un 20 %, de manera especialmente preferente de al menos un 30 %, calculándose la accesibilidad del resto de aminoácido en cuestión sobre una escala del 0 % al 100 %, significando un valor del 0 % de accesibilidad que el resto en cuestión no es accesible para el disolvente, y el 100 % representa la accesibilidad posible en un pentapéptido hipotético GGXGG.

- 20 12. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en el que el resto de aminoácido mencionado se encuentra en una zona neutra o positivamente polarizada o cargada de al menos dos restos de aminoácido directamente adyacentes sobre la superficie.

13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 12, en el que se realizan varias de las sustituciones de aminoácido mencionadas, preferentemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, de manera especialmente preferente entre 10 y 30 y de manera muy especialmente preferente entre 15 y 25.

- 25 14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 13, según el cual para la reducción de la variación de carga total en al menos una a como máximo exactamente tantas otras posiciones como las del grupo (A) o (B) se ha sustituido o se han sustituido uno o varios restos de aminoácido de la molécula de partida situados sobre la superficie de la molécula distintos con restos de aminoácido menos negativamente polares o menos negativamente cargados, siendo posibles en cada caso las siguientes sustituciones de aminoácido:

aminoácido de partida	por
K, Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Arg (R)
Y, C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Lys (K)
C, H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Tyr (Y)
H, G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Cys (C)
G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	His (H)
A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Gly (G)
V, L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Ala (A)
L, I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Val (V)
I, M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Leu (L)
M, F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Ile (I)
F, W, P, S, T, N, Q, E o D	Met (M)
W, P, S, T, N, Q, E o D	Phe (F)
P, S, T, N, Q, E o D	Trp (W)
S, T, N, Q, E o D	Pro (P)
T, N, Q, E o D	Ser (S)
N, Q, E o D	Thr (T)
Q, E o D	Asn (N)
E o D	Gln (Q)

(continuación)

aminoácido de partida	por
D	Glu (E)

- 5 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la sustitución o las sustituciones realizadas para la reducción de la variación de carga total se realiza o se realizan en una posición o en posiciones de aminoácido que no pertenece o no pertenecen a las siguientes:
- (A) 5, 6, 7, 19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 53, 72, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 118, 136, 142, 149, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 171, 172, 181, 227, 229, 247, 251, 254, 259, 260, 281, 283, 394, 395, 399, 400, 417, 418, 419, 420, 421 y 422 o
- 10 (B) 435, 436, 439, 444, 445, 449, 450, 452, 458, 459, 460, 461, 463, 465, 466, 471, 473, 475, 476 y 484 o
(C) 176, 218, 242, 302, 310, 320, 323, 359, 368, 372, 376, 383, 385 y 404,
- en cada caso indicadas en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.
16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 15, en el que en el caso de la molécula de partida se trata de una variante de α -amilasa con, con preferencia creciente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones puntuales adicionales.
- 15 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la α -amilasa introducida es una variante de α -amilasa con las mutaciones puntuales adicionales en una o varias de las siguientes posiciones: 5, 167, 170, 177, 202, 204, 271, 330, 377, 385 y 445, en la numeración de la proteína madura de acuerdo con la SEC ID N.º 2.
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que se trata de las siguientes mutaciones puntuales: 5A, 167R, 170P, 177L, 202L, 204V, 271D, 330D, 377R, 385S y/o 445Q.
- 20 19. Ácido nucleico que codifica una variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9.
20. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 19, que se deriva de un ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N.º 1, o de una variante del mismo con, con preferencia creciente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 mutaciones puntuales adicionales con respecto a aquellas mutaciones que llevan a una de las sustituciones de aminoácido designadas con las reivindicaciones 1 o 6.
- 25 21. Vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 19 o 20, preferentemente un vector de clonación o un vector de expresión.
22. Célula que después de modificación mediante ingeniería genética contiene uno de los ácidos nucleicos designados en las reivindicaciones 19 o 20.
- 30 23. Célula de acuerdo con la reivindicación 22, en la que el ácido nucleico mencionado es parte de un vector, en particular de un vector de acuerdo con la reivindicación 21.
24. Célula de acuerdo con las reivindicaciones 22 o 23, en la que se trata de una bacteria, en particular de una que secreta la variante de α -amilasa formada al medio circundante.
- 35 25. Célula de acuerdo con la reivindicación 24, en donde se trata de una bacteria Gram negativa, en particular de una de los géneros *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* o *Xanthomonas*, en particular de cepas de *E. coli* K12, *E. coli* B o *Klebsiella planticola*, y muy especialmente se trata de derivados de las cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3), *E. coli* RV308, *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109, *E. coli* XL-1 o *Klebsiella planticola* (Rf).
- 40 26. Célula de acuerdo con la reivindicación 24, en donde se trata de una bacteria Gram positiva, en particular de una de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* o *Corynebacterium*, muy especialmente de las especies *Bacillus lentus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. globigii* o *B. alcalophilus*, *Staphylococcus carnosus* o *Corynebacterium glutamicum*, y entre ellas a su vez de manera muy especialmente preferente se trata de un derivado de *B. licheniformis* DSM 13.
27. Procedimiento de producción biotecnológico para la producción de una variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45 28. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, con el uso de un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 19 o 20, de manera especialmente preferente con el uso de un vector de acuerdo con la reivindicación 21, de manera muy especialmente preferente con el uso de una célula de acuerdo con una de las reivindicaciones 22 a 26.
29. Agente que contiene una variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9.

30. Agente de acuerdo con la reivindicación 29, en donde se trata de un agente de lavado o de limpieza.
31. Agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la reivindicación 30, que contiene del 0,000001 por ciento en peso al 5 % en peso, en particular del 0,00001 al 3 % en peso de la variante de α -amilasa.
- 5 32. Agente de lavado o de limpieza de acuerdo con las reivindicaciones 30 o 31, que contiene adicionalmente otras enzimas, en particular enzimas hidrolíticas u oxidorreductasas, de manera especialmente preferente otras amilasas, proteasas, lipasas, cutinasas, hemicelulasas, celulasas, β -glucanasas, oxidasas, peroxidasas, perhidrolasas y/o lacasas.
- 10 33. Agente de lavado o de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 30 a 32, en el que la variante de α -amilasa, mediante uno de los otros constituyentes del agente se estabiliza y/o aumenta su contribución al poder de lavado o de limpieza del agente.
34. Agente de lavado o de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 30 a 33, que en conjunto es sólido, preferentemente después de una etapa de compactación para al menos uno de los componentes contenidos, de manera especialmente preferente, que en conjunto está compactado.
- 15 35. Agente de lavado o de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 30 a 34, que en conjunto es líquido, en forma de gel o pastoso, preferentemente con encapsulación para al menos uno de los componentes contenidos, de manera especialmente preferente con encapsulación de al menos una de las enzimas contenidas, de manera muy especialmente preferente con encapsulación de la variante de α -amilasa.
- 20 36. Procedimiento para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, en el que al menos a una de las etapas de procedimiento se añade una variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 y se activa.
37. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 36, en el que la variante de α -amilasa se usa por medio de un agente de acuerdo con una de las reivindicaciones 30 a 35.
- 25 38. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 36 o 37, en el que la α -amilasa en la etapa de procedimiento en cuestión se usa en una cantidad de 0,01 mg a 400 mg por etapa de procedimiento correspondiente, preferentemente de 0,02 mg a 300 mg, de manera especialmente preferente de 0,03 mg a 100 mg.
39. Uso de una variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras.
40. Uso de acuerdo con la reivindicación 39, en el que la variante de α -amilasa se usa por medio de un agente de acuerdo con una de las reivindicaciones 30 a 35.
- 30 41. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 39 o 40, en el que por aplicación, preferentemente por aplicación en una máquina lavavajillas o en una lavadora, se usan de 0,01 mg a 400 mg de la variante de α -amilasa, preferentemente de 0,02 mg a 300 mg, de manera especialmente preferente de 0,03 mg a 100 mg.
- 35 42. Uso de una variante de α -amilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 para el tratamiento de materias primas o productos intermedios en la fabricación de material textil, en particular para el desaprestado de algodón.

Figura 1

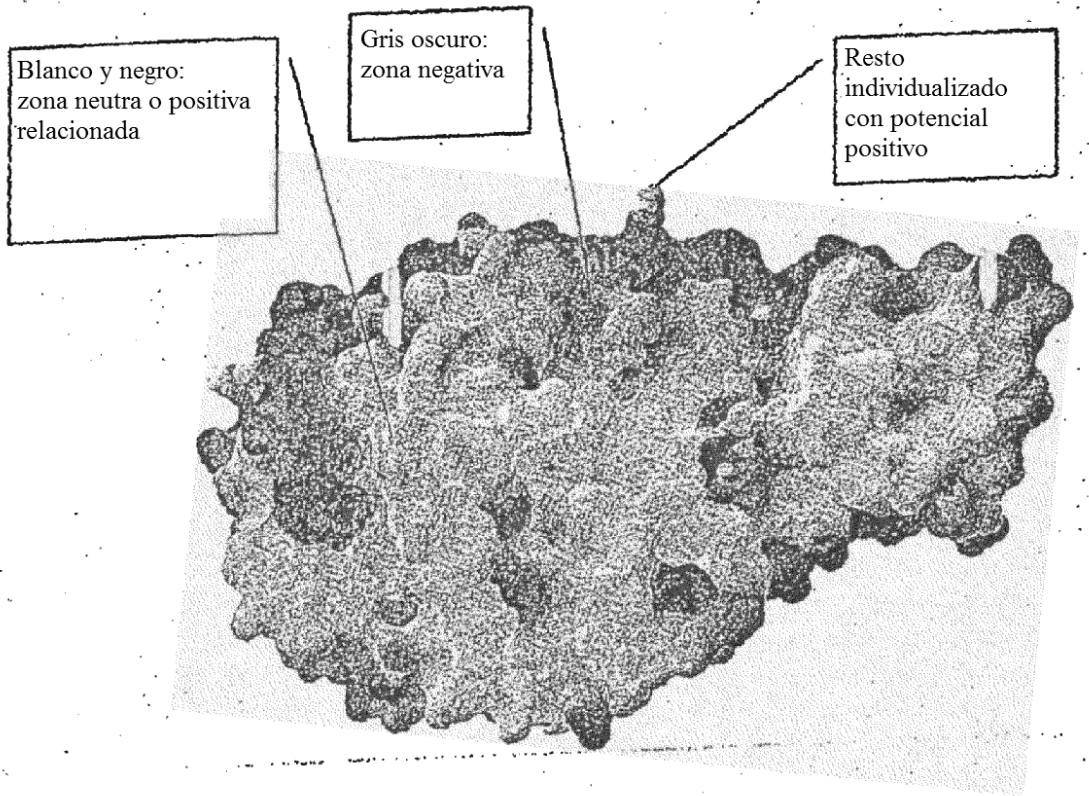


Figura 2 / Parte 1

		1		50
A 7-7	(1)	-HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRSDASNLKDKGITAVWIPP	AWK	
S707	(1)	-HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSKGITAVWIPP	AWK	
LAMY	(1)	-HHNGTNGTMMQYFEWHLPNNDGNHWNRLRDDAANLKSKGITAVWIPP	AWK	
BAA	(1)	-----VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQNDAEHLSDIGITAVWIPP	PAYK	
BLA	(1)	---ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQNDASAYLAEHGITAVWIPP	PAYK	
BStA	(1)	--AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPP	PAYK	
MK716	(1)	--AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPP	PAYK	
TS-23	(1)	ANTAPINETMMQYFEWDLPNNDGTLWTKVNEAANLSSLGITALWLPP	PAYK	
K38	(1)	--ADGLNGTMMQYFEWHLNDGQHWKRLHDDAAALSDAGITAIWIPP	PAYK	
		51		100
A 7-7	(50)	GASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRNQLQAAVTALKSNGIQV		
S707	(50)	GASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSOLQAAVTSLKNNGIQV		
LAMY	(50)	GTSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSOLQGAVTSLKNNGIQV		
BAA	(46)	GLSQSDNGYGPYDLYDLGEFQKGTVRTKYGTKSELQDAIGSLHSRNVQV		
BLA	(48)	GTSQADVGYGAYDLYDLGEFHQKGTVRTKYGTKGELQSAIKSLHSRDINV		
BStA	(49)	GTSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGAVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQV		
MK716	(49)	GTSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGAVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQV		
TS-23	(51)	GTSQSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTIRTQYGTQYIQAIAAKAAGMQV		
K38	(49)	GNSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTKAQLERAIGSLKSN	DINV	
		101		150
A 7-7	(100)	YGDVVMNHKGGADATEWVRAVEVNPNSNRNQEVS GDY TIEAWTKFDFPGRG		
S707	(100)	YGDVVMNHKGGADATEMVR AVEVNPNNRNQEVTGEYTIEAWTRFDFPGRG		
LAMY	(100)	YGDVVMNHKGGADGTEMVNAVEVNRSNRNQEISGEYTIEAWTKFDFPGRG		
BAA	(96)	YGDVVLN HKAGADATEDVTAVEVNPANRNQETSEEYQIKAWTDFRFPGRG		
BLA	(98)	YGDVVINHKGGADATEDVTAVEVDPADRNRVISGEHRIKAWTHFHFPGRG		
BStA	(99)	YADV VFDHKGGADGTEWVDAVEVNP SDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRG		
MK716	(99)	YADV VFDHKGGADGTEWVDAVEVNP SDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRG		
TS-23	(101)	YADV VFNHKAGADGTEFVDAVEVDP SDRNQETS GTYQIQAWTKFDFPGRG		
K38	(99)	YGDVVMNHKMGADFTEAVQAVQVNPTNRWQDISGAYTIDAWTGDFDFSGRN		
		151		200
A 7-7	(150)	NTHSNFKWRWYHFDGVDWDQSRQLQNRIYKFRGDGKGDWEVDTENGN	YD	
S707	(150)	NTHSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNNRIYKFRGHGKAWDWEVDTENGN	YD	
LAMY	(150)	NTHSNFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNKIYKFRGTGKAWDWEVDIENGN	YD	
BAA	(146)	NTYSDFKWHWYHFDGADWDES RK- ISRI FKFRGEGKAWDWEVSSENGN	YD	
BLA	(148)	STYSDFKWHWYHFDGTDWDES RK- LNRIYKFQG--KAWDWEVSNENGN	YD	
BStA	(149)	NTYSSFKWRWYHFDGVDWDES RK- LSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGN	YD	
MK716	(149)	NTYSSFKWRWYHFDGVDWDES RK- LSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGN	YD	
TS-23	(151)	NTYSSFKWRWYHFDGTDWDES RK- LNRIYKFRSTGKAWDWEVDTENGN	YD	
K38	(149)	NAYSDFKWRWFHFGVDWDQRYQ-ENHIFRFAN--TNWNWRVDEENGN	YD	

Figura 2 / Parte 2

		201	250
A 7-7	(200)	YLMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYTNLGLDGFRIDAVKHIKYSFTRDW	
S707	(200)	YLMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYTNLGLDGFRIDAVKHIKYSFTRDW	
LAMY	(200)	YLMYADIDMDHPEVINELRNWGVWYTNLNLNLDGFRIDAVKHIKYSYTRDW	
BAA	(195)	YLMYADVVDYDHPDVVAETKKWGIWYANELSLDGFRIDAAKHIKESFLRDW	
BLA	(195)	YLMYADIDYDHPDVAEIKRWGTWYANELQLDGFRRLDAVKHIKFSFLRDW	
BStA	(198)	YLMYADLDMDHPEVVTELKSWGKQWYVNTTNIDGFRRLDAVKHIKFSFFPDW	
MK716	(198)	YLMYADLDMDHPEVVTELKNWGWYVNTTNIDGFRRLDAVKHIKFSFFPDW	
TS-23	(200)	YLMFADLDMDHPEVVTELKNWGTWYVNTTNIDGFRRLDAVKHIKYSFFPDW	
K38	(196)	YLLGSNIDFSHPEVQDELKDWGSWFTDELDLGDRYRLDAIKHIFWYTSDW	
		251	300
A 7-7	(250)	LTHVRNTTGKNMFAVAEFWKNDIGAIENYLSKTNWNHNSVFDVPLHYNLYN	
S707	(250)	INHVSATGKNMFAVAEFWKNDLGAENYLQKTNWNHNSVFDVPLHYNLYN	
LAMY	(250)	LTHVRNTTGKPMFAVAEFWKNDLAAIENYLNKTSWNHNSVFDVPLHYNLYN	
BAA	(245)	VQAVRQATGKEMFTVAEYWQNNAGKLENYLNKTSFNQSVFDVPLHFNLQA	
BLA	(245)	VNHVREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHNSVFDVPLHYQFHA	
BStA	(248)	LSDVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYIMKTNGTMSLFDAPLHNKFYT	
MK716	(248)	LSYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYT	
TS-23	(250)	LTYVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVNKLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYT	
K38	(246)	VRHQRNEADQDLFVVGEYWKDDVGALEFYLDENMNWEMSLFDVPLNYNFYR	
		301	350
A 7-7	(300)	ASRSGGNYDMRQIFNGTVVQRHPHVAFTFVDNHDSQPPEEALESFVEEWFK	
S707	(300)	ASKSGGNYDMRNIENGTVVQRHPSHAVTFVDNHDSQPPEEALESFVEEWFK	
LAMY	(300)	ASNSGGYFDMRNILNGSVVQKHPIHAVTFVDNHDSQPGEALESFVQSWFK	
BAA	(295)	ASSQGGGYDMRRLDGTVVSRHPEKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQTWFK	
BLA	(295)	ASTQGGGYDMRKLLNSTVVSKHPLKAVTFVDNHDTQPGQSLESTVQTWFK	
BStA	(298)	ASKSGGTDMRMTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTPEPGQALQSWVDPWFK	
MK716	(298)	ASKSGGAFDMRMTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTPEPGQALQSWVDPWFK	
TS-23	(300)	ASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVTLVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFK	
K38	(296)	ASQQGGSYDMRNIILRGLSVEAHPMHAFTFVDNHDTQPGESLESWVADWFK	
		351	400
A 7-7	(350)	PLAYALTLTRDQGYPSVFYGDYYGIPHTG---VPAMKSKIDPILEARQKY	
S707	(350)	PLAYALTLTREQGYPSVFYGDYYGIPHTG---VPAMRSKIDPILEARQKY	
LAMY	(350)	PLAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPHTG---VPSMKSIDPLLQARQTY	
BAA	(345)	PLAYAFILTRESGYPQVFYGDYMYGTGKTSPEIIPSLKDNIEPILKARKEY	
BLA	(345)	PLAYAFILTRESGYPQVFYGDYMYGTGDSQREIPALKHKIEPILKARKQY	
BStA	(348)	PLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDY	
MK716	(348)	PLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDY	
TS-23	(350)	PLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYN---IPGLKSKIDPLLIARRDY	
K38	(346)	PLAYATILTREGGYPNVFYGDYYGIPNDN---ISAKKDMIDELLDARQNY	

Figura 2 / Parte 3

		401	450
A 7-7	(397)	AYGKQNDYLDHNNMIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGRNK	
S707	(397)	AYGKQNDYLDHNNIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGSKWMFVGRNK	
LAMY	(397)	AYGTQHDYFDHDDIIGWTREGDSSHPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGKHK	
BAA	(395)	AYGPQHDYIDHPDVIGWTREGDSSAAKSGLAALITDGPGGSKRMYAGLKN	
BLA	(395)	AYGAQHDYFDHDDIVGWTREGDSSVANSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQN	
BStA	(395)	AYGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQH	
MK716	(395)	AYGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQH	
TS-23	(397)	AYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPGGSKWMYVGKHK	
K38	(393)	AYGTQHDYFDHWDVVGWTREGSSSRPNSGLATIMSNPGGSKWMYVGRQN	

		451	500
A 7-7	(447)	AGQVWRDITGNRS GTVTINADGWGNFSVNGGSVSIWVNN-----	
S707	(447)	AGQVWSDITGNRTGTVTINADGWGNFSVNGGSVSIWVNK-----	
LAMY	(447)	AGQVWRDITGNRS GTVTINADGWGNFTVNGGAVSVWVKQ-----	
BAA	(445)	AGETWYDITGNRS DTVKIGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK-----	
BLA	(445)	AGETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR-----	
BStA	(445)	AGKVFDYDLTGNRS DTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVWVPRKTTVSTIAWSI	
MK716	(445)	AGKVFDYDLTGNRS DTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVWVPRRPVN-----	
TS-23	(447)	AGKVFDYDLTGNRS DTVTINADGWGEFKVNGGSVSIWVAKTSNVTFTVNNA	
K38	(443)	AGQTWTDLTGNNGASVTINGDGWGEFFTNGGSVSVYVNNQ-----	

		501	550
A 7-7	(486)	-----	
S707	(486)	-----	
LAMY	(486)	-----	
BAA	(484)	-----	
BLA	(484)	-----	
BStA	(495)	TTRPWTDEFVRWTEPRLVAWP-----	
MK716	(488)	-----	
TS-23	(497)	TTTSGQNVYVVANI PELGNWNTANAIKMNPSSYPTWKATIALPQGAIEF	
K38	(482)	-----	

		551	588
A 7-7	(486)	-----	
S707	(486)	-----	
LAMY	(486)	-----	
BAA	(484)	-----	
BLA	(484)	-----	
BStA	(516)	-----	
MK716	(488)	-----	
TS-23	(547)	KFIKKDQAGNVIWESTSNRTYTVPFSSSTGSYTASWNVF	
K38	(482)	-----	