

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 785**

51 Int. Cl.:

C11D 3/33 (2006.01)

C11D 3/36 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2011** **E 18190335 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3428260**

54 Título: **Composición limpiadora que comprende variantes de amilasa con alta estabilidad en presencia de un agente quelante**

30 Prioridad:

10.02.2010 EP 10153223

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

30.08.2024

73 Titular/es:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.0%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US

72 Inventor/es:

MEEK, MICHELLE;
SOUTER, PHILLIP FRANK;
BEWICK, LINDSAY SUZANNE;
SVENDSEN, ALLAN;
JOHANSEN, ANNETTE HELLE;
BJOERNVAD, MAD S ESKELUND;
RASMUSSEN, FRANK WIN THER;
SKJOET, MICHAEL;
LARSEN, ESKILDS EN SIGNE;
OEBRO, JENS;
KAASGAARD, SVEND y
BEIER, LARS

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 977 785 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

Composición limpiadora que comprende variantes de amilasa con alta estabilidad en presencia de un agente quelante

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones limpiadoras que comprenden variantes de una alfa-amilasa que tienen una estabilidad mejorada frente a los agentes quelantes con respecto a su enzima parental.

Antecedentes de la invención

Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis del almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos lineales y ramificados con enlace 1,4-glucosídico.

Entre las primeras alfa-amilasas bacterianas utilizadas figuraba una alfa-amilasa procedente de *B.licheniformis*, también denominada Termamyl, que ha sido ampliamente caracterizada y la estructura cristalina se ha determinado para esta enzima. Las amilasas alcalinas, tal como la alfa-amilasa derivada de *Bacillus* sp. que se describe en WO 95/26397 constituyen un grupo particular de alfa-amilasas que son de utilidad en detergentes. Muchas de estas amilasas bacterianas conocidas se han modificado para mejorar su funcionalidad en una aplicación determinada.

Termamyl y muchas alfa-amilasas muy eficaces requerían calcio para su actividad. En la estructura cristalina para Termamyl se encontró que cuatro átomos de calcio estaban unidos en la estructura de la alfa-amilasa coordinados por residuos de aminoácidos cargados negativamente. En otras alfa-amilasas la cantidad de iones calcio unidos en la estructura puede ser diferente. Este requisito para el calcio es un inconveniente en aplicaciones donde haya presentes compuestos quelantes fuertes, tales como en detergentes y en composiciones limpiadoras.

Como se ha mencionado anteriormente, es bien sabido que varias enzimas dependen del calcio o de otros iones metálicos tales como magnesio o cinc tanto para la actividad como para la estabilidad, por lo que supone un desafío desarrollar enzimas que sean estables y muestren una buena eficacia en detergentes y composiciones limpiadoras que contienen agentes quelantes. Los agentes quelantes se incorporan para reducir la dureza del agua durante el lavado, proteger los agentes blanqueadores que pueden también estar presentes, y los agentes quelantes también tienen un efecto directo sobre la eliminación de algunas manchas. La estabilidad de una enzima dependiente de calcio en un detergente a veces puede mejorarse mediante la adición de calcio al detergente, pero a menudo esto destruirá el efecto de eliminación de manchas. Además, la adición de calcio a un detergente líquido puede presentar problemas con la formulación, es decir, la estabilidad física del detergente. El documento WO99/23211 se refiere a variantes de alfa-amilasas que presentan estabilidad de pH mejorada; estabilidad de iones de calcio; y/o mayor actividad específica. El documento US 2003/211958 se refiere a variantes de alfa-amilasas con mayor termoestabilidad a pH ácido y/o a bajas concentraciones de iones de calcio.

Resumen de la invención

Por lo tanto, sería beneficioso proporcionar composiciones y variantes de alfa-amilasas que sean estables frente a los agentes quelantes y que preferiblemente tengan una capacidad limpiadora mantenida o aumentada en comparación con la alfa-amilasa parental.

Por tanto, la invención, que se define por las reivindicaciones, se refiere a una composición de limpieza como se define en la reivindicación 1.

Dicha invención se refiere a una composición de limpieza que comprende una variante de una alfa-amilasa original en donde la alfa-amilasa original es una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 6 y la variante es un polipéptido que tiene actividad amilolítica y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que comprende 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original se modifica mediante sustitución en la posición 206 por Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y que comprende además un complemento de limpieza y al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración de agente quelante inferior a 0,9 veces la concentración de citrato capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, cuando se mide a 21 °C y pH 8,0; y un adyuvante de limpieza.

En un aspecto preferido la invención se refiere a una composición de limpieza que comprende una variante de una alfa-amilasa original que comprende una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 195, 197, 198, 200, 203, 210, 212, 213, 213 y 243. en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada por sustitución en la posición 206 a Y, y que comprende además una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 en donde

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º: 6.

En un aspecto preferido la invención se refiere a una composición de limpieza que comprende una variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184, una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 243, en el que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y que comprende además una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo formado por 116, 118, 129, 133, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 en donde

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º: 6.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos lineales y ramificados con enlace 1,4-glucosídico. Las alfa-amilasas conocidas se obtienen de una amplia selección de organismos, incluidas bacterias, tales como las especies del género *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus licheniformis*; de especies de hongos, tales como *Aspergillus oryzae* (TAKA-amilasa) o *Aspergillus niger*, de plantas tales como la cebada y de mamíferos.

Enzima natural: El término alfa-amilasa “natural” denota una alfa-amilasa expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, levadura, u hongo filamentoso presente en la naturaleza. Los términos “enzima natural” y “enzima parental” pueden utilizarse de forma intercambiable cuando la enzima parental no es una enzima variante.

Enzima variante: El término “variante” se define en la presente memoria como un polipéptido que tiene actividad alfa-amilasa que comprende una alteración, tal como una sustitución, inserción, y/o delección, de uno o más (o uno o varios) residuos de aminoácidos en una o más (o una o varias) posiciones específicas de la amilasa parental o natural. Preferiblemente menos de 50 modificaciones, más preferiblemente menos de 30 modificaciones. La alfa-amilasa alterada se obtiene por intervención humana mediante la modificación de la alfa-amilasa parental.

Enzima progenitora: El término alfa-amilasa “parental”, como se utiliza en la presente memoria, significa una alfa-amilasa a la cual se realizan modificaciones para producir las alfa-amilasas variantes de la presente invención. Este término también se refiere al polipéptido con el que se compara una variante de la invención.

Propiedad mejorada: La expresión “propiedad mejorada” se define en la presente memoria como una característica asociada a una variante mejorada en comparación con la alfa-amilasa parental. Estas propiedades mejoradas incluyen, aunque no de forma limitativa, una actividad amilolítica incrementada, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo EnzChek o en el ensayo PNP-7 como se describe en la sección de ejemplos en la presente memoria; mayor capacidad limpiadora, tal como eficacia frente a la suciedad, por ejemplo, eficacia frente a manchas que contienen almidón; eliminación de manchas, evitar la aparición del color gris, estabilidad, por ejemplo, termoestabilidad, estabilidad del

pH, o estabilidad en presencia de aditivos reforzantes de la detergencia, incluidos quelantes, estabilidad en formulaciones detergentes en polvo, líquidas o en gel o composiciones de lavado de vajillas, eficacia dependiente de la temperatura y perfil de actividad alterados, actividad de pH, especificidad de sustrato, especificidad del producto y estabilidad química. La capacidad limpiadora y/o capacidad de lavado de vajillas puede medirse como se describe más adelante en “Materiales y Métodos” en la presente solicitud. Preferiblemente, las variantes de la invención incluyen una combinación de propiedades mejoradas, tales como estabilidad mejorada, capacidad limpiadora mejorada, capacidad de lavado de vajillas mejorada y/o actividad mejorada en el detergente. La estabilidad mejorada incluye tanto estabilidad durante el almacenamiento en un producto detergente concentrado como estabilidad en el detergente diluido durante el lavado. La propiedad mejorada incluye una mayor capacidad limpiadora o de lavado de vajillas a baja temperatura.

Actividad: en el presente contexto, el término “actividad” es la actividad amilolítica medida por el número de enlaces 1,4-alfa-D-glucosídicos hidrolizados en polisacáridos que contienen tres o más unidades de D-glucosa con uniones 1,4-alfa como, por ejemplo, en el almidón, por unidad de tiempo y por unidad de proteína enzimática en condiciones especificadas, por ejemplo, la actividad obtenida en condiciones especificadas por ml de muestra de enzima de g de una proteína enzimática. La actividad puede medirse en, por ejemplo, el ensayo EnzChek o en el ensayo PNP-G7 como se describe más adelante en “Materiales y Métodos”. En la presente solicitud, el término “actividad” se usa de forma intercambiable con “actividad amilolítica”. El término “actividad específica” se usa con frecuencia para describir la actividad máxima obtenida por ml (o g) de proteína enzimática.

Estabilidad química mejorada: El término “estabilidad química mejorada” se define en la presente memoria como una enzima variante que presenta retención de la actividad enzimática después de un período de incubación en presencia de una sustancia química o sustancias químicas, ya sean existentes de forma natural o sintéticas, que reduce la actividad enzimática de la enzima precursora. La estabilidad química mejorada también puede resultar en variantes que pueden catalizar mejor una reacción en presencia de dichas sustancias químicas. En un aspecto particular de la invención, la estabilidad química mejorada es una estabilidad mejorada en un detergente, en particular en un detergente líquido. La estabilidad de detergente mejorada es, en particular, una estabilidad mejorada de la actividad de alfa-amilasa cuando una variante de alfa-amilasa de la presente invención se mezcla en una formulación detergente líquida que comprende un agente quelante, el líquido también incluye geles o una pasta. La formulación detergente líquida puede referirse a detergente concentrado que se añade durante un proceso de lavado de ropa o de lavado de vajillas automático o un detergente diluido tal como solución de lavado, es decir, una solución acuosa a la que se añade el detergente concentrado.

En la presente invención, los detergentes líquidos son particularmente útiles como detergentes líquidos para lavado de ropa.

Estabilidad El término “estabilidad” incluye estabilidad durante el almacenamiento y estabilidad durante el uso, por ejemplo, durante un proceso de lavado, y refleja la estabilidad de la amilasa en función del tiempo por ejemplo, cuánta actividad se retiene cuando la amilasa se mantiene en solución, en particular en una solución detergente. Por ejemplo, la variante de alfa-amilasa puede tener una actividad residual, es decir, el nivel de actividad retenida, por encima del 70 % después de 18 horas a 31 °C. La estabilidad se ve influida por muchos factores, por ejemplo, pH, temperatura, composición del detergente, por ejemplo, cantidad y tipo de aditivo reforzante de la detergencia, tensioactivos, etc. La estabilidad de la amilasa se mide con el ensayo EnzCheck o el ensayo PNP-G7 descrito en “Materiales y Métodos”.

Estabilidad mejorada: El término “estabilidad mejorada” se define en la presente memoria como una enzima variante que presenta una mayor estabilidad que es superior a la estabilidad de la alfa-amilasa original, por ejemplo, teniendo una actividad residual superior a 70 % o teniendo al menos una mejora de 10 pp en la actividad residual con respecto a la original al cabo de 18 horas a pH 8 en presencia de (1,5 p/v) de DTPA a 31 °C cuando se mide en el ensayo EnzCheck como se describe en “Materiales y Métodos”. La mejora en puntos porcentuales (pp) en la actividad residual de la variante con respecto a la parental se calcula como la diferencia entre la actividad residual de la variante y la de la parental como se describe en “Materiales y Métodos”.

Aditivos reforzantes de la detergencia Los aditivos reforzantes de la detergencia pueden clasificarse mediante el ensayo descrito por M.K. Nagarajan y col., JAOCS, vol. 61, nº. 9 (septiembre 1984), pp. 1475-1478 para determinar el nivel mínimo de aditivo reforzante de la detergencia requerido para reducir la dureza del agua a un pH de 8 de 2,0 mM (como CaCO₃) a 0,10 mM en una solución. El aditivo reforzante de la detergencia puede ser, especialmente, un agente quelante que forma complejos solubles en agua, por ejemplo, iones calcio y magnesio.

Los agentes quelantes, o quelantes, son sustancias químicas que forman moléculas con determinados iones de metal, inactivando los iones de modo que no pueden reaccionar con otros elementos, por lo tanto un agente de unión que suprime la actividad química formando quelatos. La quelación es la formación o presencia de dos o más enlaces aparte entre un ligando y un solo átomo central. El ligando puede ser cualquier compuesto orgánico, un silicato o un fosfato. En el presente contexto, el término “agentes quelantes” comprende quelantes, agente quelante, agentes quelantes, agentes formadores de complejos, o agentes secuestrantes, que forman complejos solubles en agua con iones de metal tales como calcio y magnesio. El efecto de quelato describe la afinidad mejorada de los ligandos quelantes para un ion metálico en comparación con la afinidad de una colección de ligandos no quelantes similares para el mismo

metal. Los agentes quelantes tienen capacidad de unión con iones metálicos, en particular iones calcio (Ca^{2+}), y se han utilizado ampliamente en detergentes y composiciones en general para lavado, tal como lavado de ropa o lavado de vajilla. Sin embargo, se ha demostrado que los propios agentes quelantes inhiben la actividad enzimática. El término agente quelante se utiliza en la presente solicitud de modo intercambiable con “agente formador de complejos” o “agente quelante” o “quelante”.

Puesto que la mayor parte de las alfa-amilasas son sensibles al calcio, la presencia de agentes quelantes puede afectar a la actividad enzimática. La sensibilidad al calcio de las alfa-amilasas puede determinarse incubando una alfa-amilasa dada en presencia de un agente quelante fuerte y analizando el impacto de esta incubación en la actividad de la alfa-amilasa en cuestión. Una alfa-amilasa sensible al calcio perderá una parte importante o toda su actividad durante la incubación.

Caracterización de los agentes quelantes Como se ha mencionado, el efecto de quelato o el efecto quelante describe la afinidad mejorada de los ligandos quelantes por un ion metálico en comparación con la afinidad de una colección de ligandos no quelantes similares para el mismo metal. Sin embargo, la fuerza de este efecto de quelato puede determinarse mediante diversos tipos de ensayos o métodos de medición diferenciando o clasificando de este modo los agentes quelantes según su efecto (o fuerza) quelante.

En un ensayo preferido, los agentes quelantes pueden caracterizarse por su capacidad para reducir la concentración de iones calcio libres (Ca^{2+}) de 2,0 mM a 0,10 mM o menos a pH 8,0, por ejemplo, utilizando una prueba basada en el método descrito por M.K.Nagarajan et al., JAOCS, vol. 61, n.º 9 (septiembre de 1984), págs. 1475-1478. En el ejemplo 2a se describe un ejemplo de caracterización de agentes quelantes utilizando el método basado en Nagarajan y col.. Preferiblemente, el agente quelante requerido según la invención abarca agentes quelantes capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,1 mM o menos a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, cuando se mide a pH 8,0 a 21° C.

Preferiblemente, el agente quelante según la invención abarca agentes quelantes capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,1 mM a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, cuando se mide en cloruro de potasio 80 mM y EPPS ((ácido 4-(2-hidroxi-etil) piperazin-1-propanosulfónico)) 49 mM, a pH 8 a 21 °C. En una realización preferida específica, el agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,1 mM cuando se mide en cloruro potásico 80 mM y EPPS 49 mM, a pH 8 y 21 °C y utilizando un electrodo selectivo de iones calcio para la determinación de la concentración de calcio libre, como se describe en “Materiales y Métodos”. Por tanto, preferiblemente, los agentes quelantes abarcan agentes quelantes capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9,0 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8,0 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7,0 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6,0 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5,0 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4,0 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior 3,0 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2,0 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, cuando se ensaya a pH 8,0 y a 21° C, como se describe en “Materiales y Métodos”.

En una realización especialmente preferida, los agentes quelantes son capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide en cloruro potásico 80 mM y EPPS 49 mM a pH 8 y 21 °C a una concentración de 9 mM a 0,5 mM, preferiblemente de 9 mM a 1 mM, preferiblemente de 8 mM a 1 mM, preferiblemente de 7 mM a 1 mM, preferiblemente de 6 mM a 1 mM, preferiblemente de 5 mM a 1 mM, preferiblemente de 4 mM a 1 mM, preferiblemente de 3 mM a 1 mM, preferiblemente de 2 mM a 1 mM, preferiblemente de 9,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 8,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 7,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 6,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 5,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 4,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 3,0 a 1,5 mM, preferiblemente de 2,5 mM a 1,0 mM, preferiblemente de 2,0 mM a 1,1 mM, preferiblemente de 1,85 mM a 1,0 mM.

La reducción en la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM de Ca^{2+} de a, corresponde a la reducción de la dureza del agua de 200 ppm (como CaCO_3 en forma de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ en presencia de CO_2 ácido) a 10 ppm. El nivel mínimo de aditivo reforzante de la detergencia se calcula a partir de la sal sódica del quelante con respecto a quelante seco al 100 %.

El efecto quelante del agente quelante también puede medirse con respecto al citrato. A la concentración del citrato capaz de reducir la cantidad de concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM se le asigna al valor de 1 y los resultados de los agentes quelantes se comparan con este valor. El agente quelante preferido según la invención es capaz de reducir la concentración de calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a 0,9, tal como inferior a 0,8, tal como inferior a 0,6, tal como inferior a 0,5, tal como inferior a 0,4, tal como inferior a 0,3, tal como inferior a 0,2, tal como inferior a 0,1 veces inferior en comparación con la concentración de citrato, cuando se mide a pH 8,0 y 21 °C. El agente quelante preferido según la invención es capaz de reducir la concentración de calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a 0,9, tal como inferior a 0,8, tal como inferior a 0,7, tal como inferior a 0,5, tal como inferior a 0,4, tal como inferior a 0,3, tal como inferior a 0,2, tal como inferior a 0,1 veces inferior en comparación con la concentración de citrato, cuando se mide a pH 8,0 a 21 °C utilizando un electrodo selectivo a iones calcio para la determinación de la concentración de calcio libre cuando se mide en cloruro potásico 80 mM y EPPS 49 mM a 21 °C y pH 8,0.

En una realización especialmente preferida, el agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración de agente quelante inferior a 1,0 a 0,1, tal como inferior a 0,9 a 0,1, tal como inferior a 0,8 a 0,1, tal como inferior a 0,7 a 0,1, tal como inferior a 0,6 a 0,1, tal como inferior a 0,5 a 0,1, tal como inferior a 0,4 a 0,1, tal como inferior a 0,35 a 0,1, tal como inferior a 0,3 a 0,1 veces inferior en comparación con la concentración de citrato capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, cuando se mide a pH 8,0 y 21 °C.

Una realización adicional de la invención se refiere a una composición de limpieza que comprende una variante de una alfa-amilasa original en donde la alfa-amilasa original es una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 6 y la variante es un polipéptido que tiene actividad amilolítica y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y la variante alfa-amilasa comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que comprende 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212 y 213, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y que comprende además en al menos un agente quelante en el que dicho agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0; y un adyuvante limpiador.

En una realización preferida de la invención, la composición de limpieza comprende una variante de una alfa-amilasa original en la que la alfa-amilasa original es una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 6 y la variante es un polipéptido que tiene actividad amilolítica y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y la variante comprende una sustitución en una o más posiciones en el rango de 193 a 213, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y comprende además al menos un agente quelante en el que dicho agente quelante es capaz de reducir la concentración de ion calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración de agente quelante menor de 0,9 veces la concentración de citrato capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, cuando se mide a 21 °C y pH 8; y un adyuvante de limpieza.

Por lo tanto, el agente quelante según la invención es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a la concentración de citrato necesaria para reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM en las mismas condiciones.

De forma alternativa, la fuerza del complejo formado entre el agente quelante y los iones de metal, tales como calcio y/o magnesio, se expresa como el valor log K (constante de equilibrio o unión o disociación o estabilidad). Esta constante puede medirse a un pH determinado, a una temperatura dada y a un valor de fuerza iónica determinado.

Como se ha mencionado anteriormente, la fuerza del complejo formado entre el agente quelante y los iones metálicos, por ejemplo, calcio y/o magnesio puede expresarse como el valor log K (constante de equilibrio o unión o disociación o estabilidad); la constante puede medirse mediante calorimetría isotérmica de titulación (ITC) como se describe en A. Nielsen y col., Anal. Biochem. Vol. 314, (2003), pp. 227-234 y a partir del valor K, el log K puede calcularse como el logaritmo del valor K (base 10). El valor log K medido mediante este método dependerá de la temperatura, el pH, la fuerza iónica, por lo que es importante cuando se comparan los valores K, que se determinen en condiciones similares, preferiblemente las mismas. Además, introduciendo un patrón como referencia, tal como el citrato, pueden reducirse los impactos debidos a las variaciones en los experimentos. Preferiblemente, log K se determina como se describe en "Materiales y Métodos" de la presente solicitud. Por lo tanto, en una realización de la invención, el agente quelante en la composición según la invención tiene un valor log K de al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7, tal como al menos 8, tal como al menos 9, tal como al menos 10, tal como al menos 11, cuando log K se mide a pH 10 y a 19 °C como se describe en "Materiales y Métodos". El valor de log K del agente quelante en las composiciones según la invención puede estar también en el intervalo 3-11, tal como 3-10, tal como 3-9, tal como 3-8, tal como 4-11, tal como 5-11 tal como 6-11, tal como 4-10, tal como 5-10, tal como 4-9, tal como 5-9, tal como 4-8, especialmente 5-8. Preferiblemente, el log K del agente quelante en la composición según la invención es un factor de al menos 1, tal como al menos 1,33, tal como al menos 1,67, tal como al menos 2, tal como al menos 2,33, tal como al menos 2,67, tal como al menos 3, tal como al menos 3,33, tal como al menos 3,67 veces

el log K de citrato determinado como se describe en el Ejemplo 2b. El agente quelante en las composiciones según la invención también puede estar en el intervalo de un factor 1-3,67, tal como 1-3,33, tal como 1-3,00, tal como 1-2,67, tal como 1,33-3,67, tal como 1,33-3,33, tal como 1,33 - 3,00, tal como 1,33-2,67, tal como 1,67-3,67, tal como 1,67-3,33, tal como 1,67-3, en particular 1,67-2,67 veces el log K de citrato determinado como se describe en "Materiales y Métodos".

Agentes quelantes útiles pueden ser, aunque no de forma limitativa, los siguientes: ácido N-(1,2-dicarboxietil)-D,L-aspartico (IDS), ácido N-(2-hidroxietyl)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-N-monoacético (ASMA), ácido aspártico-N Ácido N-diacético (ASDA), ácido aspártico-N-monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil)aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil)aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil)glutámico (SMGL),

Ácido N- (2-sulfoetil) glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), α -alanina-N, ácido N-diacético (α -ALDA), serina-N, ácido N-diacético (SEDA), isoserina-N, ácido N-diacético (ISDA),

fenilalanina-N, ácido N-diacético (PHDA), ácido antranílico- N, ácido N-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-N, ácido N-diacético (SLDA), ácido taurina-N, N-diacético (TUDA), ácido sulfometil-N, N-diacético (SMDA), N- (hidroxietil) -etilendiaminatriacetato (HEDTA), dietanolglicina (DEG), aminotris (ácido metilfosfónico) (ATMP).

El agente quelante preferido puede contener un grupo amino y puede ser, por ejemplo, un amino-polycarboxilato o un fosfonato. Puede ser una molécula monomérica que comprende uno, dos o tres grupos amino (de forma típica grupos amino secundarios o terciarios), y puede contener dos, tres, cuatro o cinco grupos carboxilo o incluso más grupos carboxilo. Los agentes quelantes pueden contener fósforo o no contener fósforo. Existen muchas formas de agrupar agentes quelantes; una forma puede ser la siguiente:

Los agentes quelantes son o se basan en, grupos carboxilato como EDTA (etilendiamino tetraacetato), NTA (2,2',2"-nitrilotriacetato), citrato, 2-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxilato, DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), MGDA (ácido metilglicindiacético o N,N'-bis(carboximetil)alanina), EGTA (ácido etilenglicol tetraacético), EDDS (ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico), GLDA (ácido L-glutámico, ácido N,N-diacético), polycarboxilatos tales como PAA [poli(ácido acrílico)], PAA/PMA [copoli(ácido acrílico/ácido málico)], o mezclas de los mismos.

Los agentes quelantes que contienen fósforo pueden ser polifosfatos o fosfonatos, tales como tripolifosfato sódico (STP), HEDP (ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico), EDTMP [ácido etilendiamintetra(metilfosfónico)], EDTMPA (ácido etilendiamintetrametilen-tetrafosfónico), DTPMP (ácido dietilentriaminopenta (metilfosfónico), DTPMPA (ácido dietilentriaminopenta(metilfosfónico)). Los agentes quelantes pueden contener nitrógeno tal como en EDTA, NTA, DTPA, PDTA, GLDA, MGDA, EDDS, EDTMP, EDTMPA, y DTPMP o ASMA, ASDA, ASMP, IDA, SMAS, SEAS, SMGL, SEGL, MIDA, α -ALDA, SEDA, ISDA, PHDA, ANDA, SLDA, TUDA, SMDA, HEDTA, DEG, ATMP, o mezclas de los mismos.

Por tanto, los agentes quelantes preferidos pueden ser, aunque no de forma limitativa, los siguientes: ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), dietilentriamino-pentametilenfosfónico (DTPMPA, DTPMP), ácido hidroxietano difosfónico (HEDP), ácido etilendiamino N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicindiacético (MGDA), ácido dietilentriaminopenta-cético (DTPA), ácido propilendiaminotetraacético (PDTA), 2-hidroxipiridin-N-óxido (HPNO), ácido metilglicino-diacético (MGDA), ácido glutámico ácido N,N-diacético (ácido N,N-dicarboximetil glutámico sal tetrasódica (GLDA) y ácido nitrilotriacético (NTA) o mezclas de los mismos. Los agentes quelantes pueden estar presentes en su forma ácida o como sal; preferiblemente, los agentes quelantes pueden estar presentes como sal de sodio, amonio o potasio.

El agente quelante puede estar presente en la composición en una cantidad de 0,0001 % en peso a 20 % en peso, preferiblemente de 0,01 a 10 % en peso, más preferiblemente de 0,1 a 5 % en peso.

Alfa-amilasas de tipo Termamyl

En la Tabla 1 que sigue puede encontrarse la identidad de una serie de alfa-amilasas de *Bacillus* conocidas:

Tabla 1

Amilasa parental	Id. de sec. n.º	Porcentaje de identidad							
		n.º 707	AP1378	BAN	BSG	SP690	SP722	AA560	Termamyl
n.º 707	8	100,0	86,4	66,9	66,5	87,6	86,2	95,5	68,1
AP1378	18	86,4	100,0	67,1	68,1	95,1	86,6	86,0	69,4
BAN	14	66,9	67,1	100,0	65,6	67,1	68,8	66,9	80,7
BSG	16	66,5	68,1	65,6	100,0	67,9	67,1	66,3	65,4
SP690	12	87,6	95,1	67,1	67,9	100,0	87,2	87,0	69,2

SP722	6	86,2	86,6	68,8	67,1	87,2	100,0	86,8	70,8
AA560	10	95,5	86,0	66,9	66,3	87,0	86,8	100,0	68,3
Termamyl	20	68,1	69,4	80,7	65,4	69,2	70,8	68,3	100,0

Por ejemplo, se ha descubierto que la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 20 (disponible comercialmente como Termamyl) es aproximadamente un 81 % homóloga con la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos. se muestra en la Id. de sec. n.º: 14 (BAN) y aproximadamente un 65 % de homología con la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Id. de sec. n.º: 16 (BSG). Otras alfa-amilasas homólogas incluyen SP722 y SP690 descritas en el documento WO 95/26397 y representadas adicionalmente en la Id. de sec. n.º: 6 y la Id. de sec. n.º: 12, respectivamente, en el presente documento. Otras amilasas son la alfa-amilasa AA560 derivada de *Bacillus* sp. y mostrada en la Id. de sec. n.º: 10, y la alfa-amilasa SP707 o n.º 707 derivada de *Bacillus* sp., mostrada en la Id. de sec. n.º: 8 y descrita por Tsukamoto y col., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31. Otra homóloga es la alfa-amilasa KSM AP1378 que se describe en la id. de sec. n.º 18 en WO 97/00324 (de KAO Corporation). Otra homóloga adicional es la SPO.7-7 con la id. de sec. n.º 22. Otra amilasa original adecuada es la Id. de sec. n.º: 2 de K 38 o la amilasa de *B. circulans* con la Id. de sec. n.º: y la Id. de sec. n.º, descritas en WO2005/001064.

En un aspecto, la alfa-amilasa original una secuencia de aminoácidos que difiere (por ejemplo, mediante la inserción o sustitución) en uno o varios aminoácidos, preferiblemente en diez aminoácidos, más preferiblemente en nueve, ocho, siete, seis, preferiblemente en cinco aminoácidos, más preferiblemente en cuatro aminoácidos, aún más preferiblemente en tres aminoácidos, con máxima preferencia en dos aminoácidos, e incluso con máxima preferencia en un aminoácido respecto del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

La alfa-amilasa parental puede ser una alfa-amilasa parental sustancialmente homóloga que puede tener una o más (varias) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos. Estos cambios son, preferiblemente, de naturaleza minoritaria, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos como se describe a continuación y otras sustituciones que no afectan de forma significativa al plegamiento tridimensional o a la actividad de la proteína o polipéptido; deleciones pequeñas, de forma típica, de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones aminoterminales o carboxiterminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal, un pequeño péptido enlazante de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como una cola de polihistidina, o proteína A (Nilsson y col., 1985, 1985, EMBO J. 4: 1075; Nilsson y col., 1991, Methods Enzymol. 198: 3. Ver, también, en general, Ford y col., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

Aunque los cambios descritos anteriormente son preferiblemente de naturaleza minoritaria, estos cambios también pueden ser sustanciales, tales como la fusión de polipéptidos mayores de hasta 300 aminoácidos o más como extensiones aminoterminales o carboxiterminales.

Cuando se hace referencia a una variante particular de una alfa-amilasa parental (variante de la invención) (de forma convencional) como referencia a la modificación (por ejemplo, delección o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una alfa-amilasa parental específica, debe entenderse que se abarcan de este modo variantes de otra alfa-amilasa parental modificada en la posición o posiciones equivalentes (como se determina a partir de la mejor alineación posible de secuencias de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos respectivas).

Homología (identidad de secuencia)

La homología puede determinarse como el grado de identidad entre las dos secuencias, lo que indica una derivación de la primera secuencia de la segunda. Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o una versión superior. Los parámetros opcionales utilizados tienen una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión para EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como de "mayor identidad" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como identidad porcentual y se calcula de la siguiente forma:

$$(\text{Restos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación})$$

Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, mencionado anteriormente) según se aplica en el programa Needle del paquete informático EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y col., 2000, mencionado anteriormente), preferiblemente la versión 3.0.0 o versiones posteriores. Los parámetros opcionales utilizados tienen una penalización por apertura de hueco de 10,

una penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión para EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de Needle etiquetada como de “mayor identidad” (obtenida usando la opción –nobrief) se usa como identidad porcentual y se calcula de la siguiente forma:

$$5 \quad (\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación})$$

La homología o identidad de secuencia también puede determinarse como el grado de identidad entre las dos secuencias, lo que indica una derivación de la primera secuencia de la segunda. La homología puede determinarse adecuadamente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica, tales como GAP, proporcionado en el paquete informático GCG. Por lo tanto, Gap GCGv8 puede utilizarse con la matriz de puntuación por defecto para identidad y para los siguientes parámetros por defecto: La penalización por introducción de huecos de 5,0 y la penalización por extensión de huecos de 0,3, respectivamente para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos, y la penalización por introducción de huecos de 3,0 y la penalización por extensión de huecos de 0,1, respectivamente, para la comparación de secuencias de proteínas. GAP utiliza el método de Needleman y Wunsch, (1970), J.Mol. Biol. 48, pp. 443-453, para hacer alineaciones y para calcular la identidad.

Puede utilizarse una alineación estructural entre, por ejemplo, Termamyl y una alfa-amilasa para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras alfa-amilasas. Un método de obtención de dicha alineación estructural es utilizar el programa Pile Up del paquete informático GCG utilizando valores por defecto de penalizaciones por huecos, es decir, una penalización por introducción de huecos de 3,0 y una penalización por extensión de huecos de 0,1. Otros métodos de alineación estructural incluyen el análisis cluster hidrófobo (Gaboriaud y col., (1987), FEBS LETTERS 224, p. 149-155) y formación inversa de cadenas (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE vol. 7, n.º. 1 pp. 142-149 (1998). Las propiedades de las alfa-amilasas, es decir, la reactividad inmunológica cruzada, pueden analizarse utilizando un anticuerpo frente a, o reactivo con, al menos un epítipo de la alfa-amilasa de tipo Termamyl relevante. El anticuerpo, que puede ser monoclonal o policlonal, puede producirse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como describen Hudson y col., Practical Immunology, tercera edición (1989), Blackwell Scientific Publications. La reactividad inmunológica cruzada puede determinarse utilizando ensayos conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales es el Western blot o la inmunodifusión radial, por ejemplo, según lo descrito por Hudson y col., 1989.

30 Hibridación

En un aspecto, el polipéptido original que tiene actividad amilolítica está codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones de restrictividad muy baja, preferiblemente en condiciones de restrictividad baja, más preferiblemente condiciones de restrictividad media, más preferiblemente en condiciones de restrictividad media-alta, aún más preferiblemente en condiciones de restrictividad alta, y con máxima preferencia en condiciones de restrictividad muy alta con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, New York). La subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad amilolítica.

Puede prepararse adecuadamente una sonda de oligonucleótidos utilizada en la caracterización de la alfa-amilasa según la propiedad deseada, que puede ser la actividad alfa-amilasa sobre la base de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos completa o parcial de la alfa-amilasa en cuestión.

Las condiciones adecuadas para ensayar la hibridación implican remojar previamente en 5xSSC (citrato sódico estándar, 1 x SSC corresponde a NaCl 0,1650 M) y prehibridizar durante 1 h a ~40 °C en una solución de formamida al 20 %, solución de Denhardt 5x fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, y 50 mg de ADN de timo de ternera sonificado desnaturalizado, seguido de hibridación en la misma solución suplementada con ATP (adenosín trifosfato) 100 mM durante 18 horas a ~40 °C, seguido de lavado del filtro tres veces en 2xSSC, SDS al 0,2 % (dodecilsulfato sódico) durante 30 minutos a 40 °C (restrictividad baja), preferiblemente a 50 °C (restrictividad media), más preferiblemente al 65 °C (restrictividad alta), aún más preferiblemente a ~75 °C (restrictividad muy alta). Pueden verse más detalles sobre el método de hibridación en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, 1989.

En el presente contexto, “obtenida de” indica no solamente a una alfa-amilasa producida o que puede producirse por medio del organismo en cuestión, sino también a una alfa-proteína codificada por una secuencia de ADN aislada a partir de dicha cepa y producida en un organismo hospedador transformado con dicha secuencia de ADN. Por último, el término se refiere a una alfa-amilasa, codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la alfa-amilasa en cuestión. El término también indica que la alfa-amilasa parental puede ser una variante de una alfa-amilasa de origen natural, es decir, una variante, que es el resultado de una modificación (inserción, sustitución, delección) de uno o más residuos de aminoácidos de la alfa-amilasa de origen natural.

Métodos de preparación de variantes de alfa-amilasa

En la técnica se conocen varios métodos de introducción de mutaciones en genes. Después de una breve descripción de la clonación de secuencias de ADN que codifican alfa-amilasa, se describirán los métodos para generar mutaciones en sitios específicos dentro de la secuencia codificante de alfa-amilasa.

Clonación de una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa

La secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa parental puede aislarse de cualquier célula o microorganismo que produzca la alfa-amilasa en cuestión, utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. Primero, debe construirse una genoteca de ADN genómico y/o ADNc utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la alfa-amilasa a estudiar. Seguidamente, si la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa es conocida, pueden sintetizarse sondas de oligonucleótidos conocidas, homólogas y marcadas para identificar clones que codifiquen la alfa-amilasa de una genoteca preparada a partir del organismo en cuestión. De forma alternativa, podría utilizarse una sonda de oligonucleótidos marcada que contenga secuencias homólogas a un gen de alfa-amilasa conocido como sonda para identificar clones que codifican alfa-amilasa, utilizando condiciones de hibridación y lavado de baja restrictividad.

Otro método para identificar clones que codifican alfa-amilasa implicaría la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar las bacterias alfa-amilas-negativas con la genoteca de ADN resultante y a continuación colocar las bacterias transformadas en agar que contiene un sustrato para alfa-amilasa, permitiendo de este modo identificar los clones que expresen la alfa-amilasa.

De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la enzima puede prepararse sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosforoamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, (1981) Tetrahedron Letters 22: 1859 o el método descrito por Matthes y col. (1984), EMBO J. 3 801 - 805. En el método de la fosforoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, aparean, ligan y clonan en vectores adecuados.

Por último, la secuencia de ADN puede ser de origen genómico y sintético mixto, de origen sintético y ADNc mixto o de origen genómico y de ADNc mixto, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según proceda, los fragmentos que corresponden a varias partes de la secuencia completa de ADN), según técnicas estándar. La secuencia de ADN también puede prepararse mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos, por ejemplo, como se describe en la patente US-4.683.202 o en R.K. Isolauri y col. (1988), Science vol. 239. 4839 pp. 487-491.

Mutagénesis dirigida al sitio

Una vez se ha aislado una secuencia de ADN que codifica para alfa-amilasa, y se han identificado sitios deseables de mutación, pueden introducirse mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados; los nucleótidos mutantes se insertan durante la síntesis de oligonucleótidos. En un método específico, se crea un hueco monocatenario de ADN, que puentea la secuencia codificante de alfa-amilasa, en un vector que lleva el gen de alfa-amilasa. A continuación, el nucleótido sintético que contiene la mutación deseada, se aparea con una parte homóloga del ADN monocatenario. El hueco restante se rellena a continuación con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y el constructo se liga utilizando T4 ligasa. Un ejemplo específico de este método se describe en Morinaga y col. 1984 Biotechnology 2, pp. 636-639. En la US-4.760.025 se describe la introducción de oligonucleótidos que codifican múltiples mutaciones llevando a cabo alteraciones menores del casete. Sin embargo, puede introducirse una variedad aún mayor de mutaciones en cualquier momento mediante el método de Morinaga, debido a que puede introducirse una multitud de oligonucleótidos de diversas longitudes.

Otro método de introducción de mutaciones en las secuencias de ADN que codifican alfa-amilasa se describe en Nelson y Long (1989). Esto implica la generación en 3 etapas de un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada introducida utilizando una cadena de ADN sintetizada químicamente como uno de los iniciadores en las reacciones de PCR. A partir del fragmento generado mediante PCR, puede aislarse un fragmento de ADN que lleva la mutación con el corte con endonucleasas de restricción y su reinserción en un plásmido de expresión.

Mutagénesis al azar

La mutagénesis al azar se realiza adecuadamente como mutagénesis al azar localizada o específica de región en al menos tres partes del gen que se traduce a la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o dentro del gen completo.

La mutagénesis al azar de una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa parental puede realizarse convenientemente mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica.

En relación con lo anterior, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para generar una variante de una alfa-amilasa parental, por ejemplo, en donde la variante presenta una afinidad de almidón alterada con respecto a la parental, comprendiendo el método:

(a) someter a mutagénesis al azar una secuencia de ADN que codifica la alfa-amilasa original,

(b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la etapa (a) en una célula huésped, y

(c) analizar las células huésped que expresan una variante de alfa-amilasa que tiene una afinidad al almidón alterada con respecto a la alfa-amilasa original.

La etapa (a) del método anterior de la invención preferiblemente se lleva a cabo usando iniciadores dopados. Por ejemplo, la mutagénesis al azar puede realizarse mediante el uso de un agente de mutagénesis físico o químico, mediante el uso de un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis al azar puede realizarse mediante el uso de cualquier combinación de estos agentes mutágenos. El agente mutágeno puede ser, por ejemplo, un agente que induce transiciones, transversiones, inversiones, mezclado, delecciones y/o inserciones.

Ejemplos de un agente mutágeno físico o químico adecuado para el presente propósito incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil-hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito sódico, ácido fórmico y análogos de nucleótidos. Cuando se utilizan dichos agentes, la mutagénesis se realiza, de forma típica, incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima parental a mutagenizar en presencia del agente mutágeno elegido en condiciones adecuadas para que se produzca la mutagénesis, y seleccionando el ADN mutado que tenga las propiedades deseadas. Cuando la mutagénesis se realiza mediante el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede doparse o suplementarse con los tres nucleótidos no parentales durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben cambiarse. El dopado o la suplementación puede hacerse de modo que se eviten los codones para aminoácidos no deseados. El oligonucleótido dopado o suplementado puede incorporarse al ADN que codifica la enzima alfa-amilasa mediante cualquier técnica publicada, por ejemplo, utilizando PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ligasa, según se considere apropiado. Preferiblemente, el dopado se lleva a cabo utilizando "dopado aleatorio constante", en el que se predefine el porcentaje de la cepa natural y de la mutación en cada posición. Además, el dopado puede dirigirse a una preferencia por la introducción de determinados nucleótidos y, de este modo, una preferencia por la introducción de uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopado puede hacerse, por ejemplo, para permitir la introducción de 90 % de la cepa natural y 10 % de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la selección de un esquema de dopado se fundamenta en las restricciones genéticas y estructurales de la proteína. El esquema de dopado puede realizarse utilizando el programa DOPE que, entre otras cosas, asegura que se evite la introducción de codones de terminación. Cuando se utiliza la mutagénesis generada por PCR, se somete a PCR bien un gen tratado químicamente o bien no tratado que codifica para una alfa-amilasa parental en condiciones que aumentan la incorporación errónea de nucleótidos (Deshler 1992, Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, 9(4), pp. 103-106; Leung y col., 1989 Technique, vol.1, pp. 11-15). A mutator strain of *E. coli* (Fowler y col., 1974, Molec. Gen. Genet., 133, p. 179 - 191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano puede utilizarse para la mutagénesis al azar del ADN que codifica la alfa-amilasa mediante, por ejemplo, transformación de un plásmido que contiene la glicosidasa original en la cepa mutante, haciendo crecer la cepa mutante con el plásmido y aislando el plásmido mutado de la cepa mutante. El plásmido mutado puede transformarse posteriormente en el organismo de expresión. La secuencia de ADN que se someterá a mutagénesis puede estar presente convenientemente en una genoteca o biblioteca de ADNc preparada a partir de un organismo que expresa la alfa-amilasa parental. De forma alternativa, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado tal como un plásmido o un bacteriófago, que como tal puede ser incubado con, o exponerse de otro modo al, agente mutágeno. El DNA que va a mutagenizarse también puede estar presente en una célula huésped estando integrado en el genoma de dicha célula o estando presente en un vector de la célula. Por último, el ADN a mutagenizar puede estar en forma aislada. Se entenderá que la secuencia de ADN que se someterá a mutagénesis al azar es, preferiblemente, un ADNc o una secuencia de ADN genómico. En algunos casos puede ser conveniente amplificar la secuencia de ADN mutada antes de llevar a cabo la etapa de expresión b) o la etapa de análisis c). Dicha amplificación puede realizarse según métodos conocidos en la técnica, siendo el método actualmente preferido la amplificación generada por PCR utilizando iniciadores de oligonucleótidos preparados sobre la base de la secuencia de ADN o aminoácidos de la enzima parental. Después de la incubación con, o de la exposición al, agente de mutagénesis, el ADN mutado se expresa cultivando una célula huésped adecuada que lleva la secuencia de ADN en condiciones que permiten que se produzca la expresión. La célula huésped utilizada para este propósito puede ser una que se haya transformado con la secuencia de ADN mutada, opcionalmente presente en un vector, o una que lleve la secuencia de ADN que codifica la enzima parental durante el tratamiento de mutagénesis. Ejemplos de las células huésped adecuadas son las siguientes: bacterias grampositivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gramnegativas, tales como *E. coli*. La secuencia de ADN mutada puede comprender también una secuencia de ADN que codifica funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN mutada.

Mutagénesis al azar localizada

La mutagénesis al azar puede localizarse favorablemente en una parte de la alfa-amilasa parental en cuestión. Esto puede, por ejemplo, ser ventajoso cuando determinadas regiones de la enzima se han identificado como especialmente importantes para una determinada propiedad de la enzima, y al modificarla se espera que dé lugar a una

variante con propiedades mejoradas. Dichas regiones pueden identificarse, normalmente, cuando se ha dilucidado la estructura terciaria de la enzima parental y se relaciona con la función de la enzima.

La mutagénesis al azar localizada o específica de región se lleva a cabo de forma conveniente mediante el uso de técnicas de mutagénesis generada por PCR como se ha descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN a modificar puede aislarse, por ejemplo, mediante inserción en un vector adecuado, y dicha parte puede someterse posteriormente a mutagénesis mediante el uso de cualquiera de los métodos de mutagénesis descritos anteriormente.

Métodos alternativos para proporcionar variantes de alfa-amilasa

Métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen el método de transposición de genes conocido en la técnica, incluidos los métodos, por ejemplo, descritos en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

Expresión de variantes de alfa-amilasa

Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida mediante los métodos descritos anteriormente, o mediante cualquier método alternativo conocido en la técnica, puede expresarse, en forma de enzima, utilizando un vector de expresión que incluye de forma típica secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión a ribosoma, señal de inicio de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o diversos genes activadores.

El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de alfa-amilasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda someterse adecuadamente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá con frecuencia de la célula huésped en la que vaya a introducirse. Por lo tanto, el vector puede ser un vector que se replica de forma autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extra-cromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando es introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el (los) cromosoma(s) en el (los) que ha sido integrado.

En el vector, la secuencia de ADN debe estar operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida y puede obtenerse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas para la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de alfa-amilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón lac de *E. coli*, promotores del gen *dagA* de agarasa de *Streptomyces avermitilis*, los promotores del gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores de la alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, etc. Para la transcripción en un huésped fúngico, son ejemplos de promotores útiles los obtenidos del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *A. niger*, la alfa-amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*.

El vector de expresión de la invención puede también comprender un terminador de transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación conectadas operativamente a la secuencia de ADN que codifica la variante de alfa-amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y poliadenilación pueden obtenerse adecuadamente de las mismas fuentes que el promotor.

El vector puede también comprender una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

El vector puede comprender también un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped, como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiera resistencia a antibióticos como los de resistencia a ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que genera la resistencia a la higromicina o la selección puede lograrse mediante cotransformación, por ejemplo, como se describe en WO 91/17243.

Aunque la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, por ejemplo, cuando se usan determinadas bacterias como células huésped, generalmente se prefiere que la expresión sea extracelular. En general, las alfa-amilasas de *Bacillus* mencionadas en la presente memoria comprenden una prerregión que permite la secreción de la proteasa expresada en el medio de cultivo. Si se desea, esta prerregión puede reemplazarse por una prerregión o

secuencia de señal distinta convenientemente obtenida mediante la sustitución de las secuencias de ADN que codifican las prerregiones respectivas.

Los procedimientos utilizados para ligar el constructo de ADN de la invención que codifica una variante de alfa-amilasa, el promotor, el terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, 1989).

Una célula que comprende un constructo de ADN o un vector de expresión como se ha definido anteriormente, se utiliza, de forma ventajosa, como célula huésped en la producción recombinante de una variante de alfa-amilasa para su uso en la invención. La célula puede transformarse convenientemente con el constructo de ADN de la presente invención, que codifica la variante, mediante la integración del constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma del huésped. De forma general, se considera que esta integración es una ventaja ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga en la célula de forma estable. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede llevarse a cabo según métodos convencionales, por ejemplo, por recombinación homóloga o heteróloga. De forma alternativa, la célula puede transformarse con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huésped.

La célula puede ser una célula de un organismo superior, tal como un mamífero o un insecto, pero preferiblemente es una célula microbiana, por ejemplo, una célula bacteriana o fúngica (incluidas levaduras).

Ejemplos de bacterias adecuadas son bacterias grampositivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gramnegativas, tales como *E. coli*. La transformación de las bacterias puede realizarse, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos o mediante el uso de células competentes de una manera conocida *per se*.

El organismo de levadura puede seleccionarse favorablemente de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede pertenecer ventajosamente a una especie de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huésped de *Aspergillus* se describe en EP 238 023.

Un método adecuado para producir una variante de alfa-amilasa para su uso en la invención comprende cultivar una célula huésped del modo anteriormente descrito en condiciones favorables para la producción de la variante y recuperar la variante de las células y/o medio de cultivo.

El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar la célula huésped en cuestión y obtener la expresión de la variante de alfa-amilasa de la invención. Los medios adecuados son comercializados por proveedores comerciales o pueden prepararse según recetas publicadas (p. ej., como se describe en los catálogos de la American Type Culture Collection).

La variante de alfa-amilasa secretada de las células huésped puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo por medio de procedimientos bien conocidos que incluyen separar las células del medio por centrifugación o filtración, y precipitar los componentes proteicos del medio mediante una sal como el sulfato amónico, seguido del uso de procedimientos cromatográficos, como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

Convenciones para la designación de variantes

Usando el sistema de numeración que se origina a partir de la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa descrita en la Id. de sec. n.º: 6 alineada con la secuencia de aminoácidos de una serie de otras alfa-amilasas, es posible indicar la posición de un residuo de aminoácido en una alfa-amilasa en regiones de homología estructural.

En la descripción de las diversas variantes de alfa-amilasa de la presente invención, la nomenclatura que se describe más adelante se ha adaptado para facilitar su consulta. En todos los casos, se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o en triplete aceptada por la IUPAC.

En la presente memoria y reivindicaciones se utilizan los códigos convencionales de una letra y tres letras para los residuos de aminoácidos. Para facilitar su consulta las variantes de alfa-amilasa de la invención se describen mediante el uso de la siguiente nomenclatura:

Aminoácido(s) original(es): posición (es): del (de los) aminoácido(s) sustituido(s).

Según esta nomenclatura, por ejemplo, la sustitución de alanina por asparagina en la posición 30 se muestra como:

Ala30Asn o A30N

una delección de alanina en la misma posición se muestra como:

Ala30* o A30*

y la inserción de un residuo de aminoácido adicional después de la posición 30, tal como lisina, se muestra como:

Ala30AlaLys o A30AK

Una delección de una secuencia consecutiva de residuos de aminoácidos, como los residuos de aminoácidos 30-33, se indica como (30-33)* o Δ(A30-N33). La delección de un solo residuo de aminoácido puede describirse simplemente como 30*.

Cuando una alfa-amilasa específica contiene una “delección” en comparación con otras alfa-amilasas y se hace una inserción en dicha posición, esto se indica como:

*36Asp o *36D

para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36.

Las mutaciones múltiples pueden separarse por signos más o con un espacio, es decir:

Ala30Asn + Glu34Ser o A30N+E34S

Ala30Asn Glu34Ser o A30N E34S

que representan mutaciones en las posiciones 30 y 34 que sustituyen alanina y ácido glutámico por asparagina y serina, respectivamente.

De forma alternativa, pueden separarse múltiples mutaciones por comas o puntos y coma, es decir:

Ala30Asn, Glu34Ser o A30N, E34S

Las mutaciones múltiples aún más simplificadas pueden separarse mediante un espacio, por ejemplo,

Ala30Asn Glu34Ser o A30N E34S

De forma alternativa, las múltiples mutaciones pueden separarse mediante comas o puntos y coma.

Cuando uno o más residuos de aminoácidos alternativos pueden insertarse en una posición determinada, se indica como

A30N,E o

A30N o A30E

De forma alternativa, uno o más residuos de aminoácidos alternativos pueden insertarse en una posición determinada; se indica como:

A30 [N, E] o A30 [N E], alternativamente A30 {N, E} o A30 (N E)

Para mayor simplicidad, el aminoácido alternativo que podría sustituirse en una determinada posición puede indicarse como:

A30 N, E, H, L o V

Además, cuando una posición adecuada para la modificación se identifica en la presente memoria sin que se sugiera ninguna modificación específica, debe entenderse que cualquier residuo de aminoácido puede sustituirse por el residuo de aminoácido presente en la posición. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 30, pero no se especifica, debe entenderse que la alanina puede eliminarse o sustituirse por cualquier otro aminoácido, es decir, cualquiera de:

R,N,D,A,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

Además, “A30X” significa cualquiera de las siguientes sustituciones:

A30R, A30N, A30D, A30C, A30Q, A30E, A30G, A30H, A30I, A30L, A30K, A30M, A30F, A30P, A30S, A30T, A30W, A30Y, o A30 V; de forma abreviada: A30R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

O, por ejemplo, A30 [R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V]

El experto en la técnica sabría que utilizar una numeración, por ejemplo, según la id. de sec. n.º 6 significa utilizar id. de sec. n.º para contrarrestar, no que la parental sea necesariamente id. de sec. n.º 6 sino simplemente que las posiciones a alterar se definen según la id. de sec. n.º 6. Por lo tanto, otra forma de describir las sustituciones específicas es indicar el aminoácido que se va a alterar con una X. Por lo tanto, X30N significa que cualquier aminoácido presente en la posición 30 podría sustituirse por N indicando que puede utilizarse una alfa-amilasa distinta como alfa-amilasa parental.

Por lo tanto, la nomenclatura “X30N” o “X30V” significa que cualquier aminoácido que puede estar en la posición 30 en la alfa-amilasa parental está sustituido por una asparagina o una valina.

Características de residuos de aminoácidos

Aminoácidos cargados:

Asp, Glu, Arg, Lys, His

Aminoácidos cargados negativamente (con el residuo más negativo primero):

Asp, Glu

Aminoácidos cargados positivamente (con el residuo más positivo primero):

Arg, Lys, His

Aminoácidos neutros:

Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Met, Cys, Asn, Gln, Ser, Thr, Pro

Residuos de aminoácidos hidrófobos (con el residuo más hidrófobo indicado en último lugar):

Gly, Ala, Val, Pro, Met, Leu, Ile, Tyr, Phe, Trp,

Aminoácidos hidrófobos (con el residuo más hidrófobo indicado en último lugar):

Thr, Ser, Cys, Gln, Asn

Esta nomenclatura es particularmente relevante para las modificaciones que implican sustituir, insertar o eliminar residuos de aminoácidos que tienen propiedades comunes específicas. Dichas modificaciones se mencionan como modificación o modificaciones conservadoras de aminoácidos. Hay ejemplos de modificaciones conservadoras dentro del grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), de los aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), de los aminoácidos polares (glutamina y asparagina), de los aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y de los aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las modificaciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y han sido descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Los intercambios que tienen lugar con más frecuencia son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly y los inversos (Taylor, 1986, *Journal of Theoretical Biology* 119: 205-218).

Variantes útiles en la invención

Las variantes útiles tienen actividad amilolítica Y comprenden alteraciones en uno o más, o uno o varios residuos de aminoácidos en la región 193 a 213 de la alfa-amilasa original, en donde la secuencia de alfa-amilasa original se modifica en la posición 206 a Y. En una realización particularmente preferida, la variante que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 Y además una alteración en uno o más o varios residuos de aminoácidos en la región 193 a 213, en donde la numeración corresponde al polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6, es decir, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. Los inventores han descubierto que dichas alteraciones proporcionan variantes que tienen una mayor estabilidad en composiciones que comprenden un agente quelante, especialmente cuando los agentes quelantes son capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9,0 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8,0 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7,0 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6,0 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5,0 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4,0 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3,0 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2,0 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe más adelante en “Materiales y Métodos”.

Un primer aspecto de la invención, que se define por las reivindicaciones, se refiere a una composición de limpieza que comprende una variante de una alfa-amilasa original en donde la variante comprende una sustitución en una o más posiciones en el intervalo 193 a 213, en donde la secuencia de alfa-amilasa original se modifica en la posición 206 a Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y opcionalmente comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración por debajo de 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, y un adyuvante de limpieza.

Un aspecto adicional proporciona una composición de limpieza que comprende una variante que comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que comprende 195, 193, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original se modifica en la posición 206 a Y, (usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6) en donde dicha composición comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración por debajo de 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0.

Un aspecto adicional se refiere a una composición de limpieza en la que el agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide en cloruro de potasio 80 mM y EPPS 49 mM a 21 °C y pH 8,0.

Un cuarto aspecto se refiere a una composición de limpieza en la que el agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide en el ensayo descrito en "Material y métodos".

Por lo tanto, en un aspecto preferido de la invención, la variante comprende al menos una sustitución en una o más posiciones en el intervalo correspondiente a las posiciones 193 a 213 del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6, en donde la secuencia de alfa-amilasa original se modifica en la posición 206 a Y. Los términos "usando la numeración según" o "correspondiente a" se refieren al sistema de numeración usado en la presente solicitud, Y las dos expresiones se usan indistintamente en la solicitud. Por lo tanto, la posición 195 es el aminoácido correspondiente a la posición 195 en la Id. de sec. n.º 6 Cuando hay delecciones, la contabilización se realiza como si no hubiera delecciones presentes.

En una realización particularmente preferida, la composición comprende una variante, cuya variante comprende una alteración en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y una alteración en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 (usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6).

En una realización particularmente preferida, la composición comprende una variante, cuya variante comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y además una alteración en uno o más o uno o varias posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 234, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y una alteración en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447 (usando numeración según la Id. de sec. n.º: 6).

En un aspecto de la presente invención, la composición de limpieza comprende una variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en una o más, o una o varias posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 86 %, preferiblemente al menos el 87 %, preferiblemente al menos el 88 %, preferido al menos el 89 %, especialmente preferido al menos el 90 %, preferido al menos el 91 %, preferido al menos el 92 %, preferido al menos el 93 %, preferido al menos el 94 %, preferido al menos el 95 %, preferido al menos el 96 %, preferido al menos el 97 %, preferido al menos el 98 %, preferido al menos el 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original y en donde la variante tiene al menos 70 % de actividad residual, preferiblemente al menos 75 % actividad residual, preferiblemente al menos 80 % de actividad residual, preferiblemente al menos 85 % de actividad residual, preferiblemente al menos 90 % de actividad residual, preferiblemente al menos 95 % de actividad residual, preferiblemente al menos 100 % de actividad residual, preferiblemente al menos 105 % de actividad residual, preferiblemente al menos un 110 % de actividad residual o tiene una actividad residual que es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejorada en comparación con la actividad residual de la alfa-amilasa original, cuando la actividad residual se determina después de 18 horas a pH 8 y 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 (ver "Material y métodos" para más detalles) en presencia de un agente quelante en el que dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe a continuación.

La composición según la invención que comprende preferiblemente una alfa-amilasa en la que la alfa-amilasa original se modifica en 206 a Y, y por al menos una de las siguientes sustituciones: 193 es [G,A,S,T o M]; la posición 195 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 197 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 198 es [Q o N]; la posición 200 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 203 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 210 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 212 es [F,W,Y,L,I o V] o la posición 213 es [G,A,S,T o M] en donde las posiciones corresponden a la posición del polipéptido maduro con la Id. de sec. n.º: 6 y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM al medirla a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos”.

La composición según la invención y definida por las reivindicaciones comprende preferiblemente una variante de alfa-amilasa en donde la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y en donde la alfa-amilasa original se modifica adicionalmente mediante al menos una de las siguientes sustituciones: 193 es [G,A,S,T o M]; la posición 195 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 197 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 198 es [Q o N]; la posición 200 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 203 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 210 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 212 es [F,W,Y,L,I o V] o la posición 213 es [G,A,S,T o M] en donde las posiciones corresponden a la posición del polipéptido maduro con la Id. de sec. n.º: 6 y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM al medirla a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos”.

En particular, la invención se refiere a una composición que comprende una alfa-amilasa en donde la secuencia de aminoácidos se modifica mediante al menos una de las siguientes sustituciones: 193 es T; la posición 195 es F o Y; la posición 197 es F o L; la posición 198 es N; la posición 200 es F; la posición 203 es F; la posición 210 es Y; la posición 212 es V; la posición 213 es A, en donde las posiciones corresponden a la posición del polipéptido maduro con la Id. de sec. n.º: 6 y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM al medirla a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos”.

En un aspecto adicional, la composición comprende una variante de alfa-amilasa, en la que dicha variante comprende una sustitución en dos o más, o dos o varias, posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante El agente en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en la sección “Material y Métodos”.

En aún un aspecto adicional, la composición comprende una variante de alfa-amilasa, en donde la variante comprende al menos dos o más, o al menos tres o más, delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en dos o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, en donde la Las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y que comprenden además al menos un agente quelante en el que dicho agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Material y métodos”, y en el que la variante tiene al menos un 70 % de actividad residual, preferiblemente al menos un 75 % de actividad residual, preferiblemente al menos un 80 % de actividad residual, preferiblemente al menos un 85 % de actividad residual, preferiblemente al menos 90 % de actividad residual, preferiblemente al menos 95 % de actividad residual, preferiblemente al menos 100 % de actividad residual, preferiblemente al menos 105 % de actividad residual, preferiblemente al menos 110 % de actividad residual o tiene una actividad residual que es de al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejorados en comparación con la actividad residual de la alfa-amilasa original, cuando la actividad residual se determina después de 18 horas a pH 8 y 31 °C. como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 (ver “Material y métodos” para más detalles) en presencia de un agente quelante en el que dicho agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe a continuación.

En realizaciones preferidas, las al menos dos delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 se seleccionan del grupo que consiste en 181*+182*, 181*+183*, 182*+ 183*, 181*+184*, 182*+184* y 183*+184*.

En un aspecto aún adicional, la composición comprende una variante de alfa-amilasa, en donde la variante comprende al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en dos o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y una alteración en una o más, o una o varias, posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458

(usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6), y que comprende además al menos un quelante agente en el que dicho agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Material y métodos”.

- 5 En un aspecto de la invención, la composición comprende al menos un agente quelante en el que dicho agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0 y SP722. + D183* G184* N195F V206Y Y243F;.

10 Otra realización de la invención se refiere a una composición de limpieza, en donde la actividad residual de la variante es al menos 70 %, tal como al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 100 %, tal como al menos 105 %, tal como al menos 110 %, tal como al menos 115 % de actividad residual en comparación con la alfa-amilasa original en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos” y cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8 a 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 descrito en “Materiales y Métodos”.

25 Otra realización de la invención se refiere a una composición de limpieza, en donde la actividad residual de la variante es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejor comparada con la actividad residual de la alfa-amilasa original en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante, a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos” y cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8 a 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 descrito en “Materiales y Métodos”. La mejora en puntos porcentuales (pp) en la actividad residual de la variante con respecto a la parental se calcula como la diferencia entre la actividad residual de la variante y la de la parental.

40 Por lo tanto, en un aspecto particular de la invención, la composición comprende un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en: agentes quelantes que contienen fósforo, que no contienen fósforo, que contienen carboxilato, que contienen nitrógeno o que no contienen nitrógeno, los agentes quelantes preferidos son EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP y HEDP y mezclas de los mismos.

45 En un aspecto preferido de la invención, la variante comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212 y 213, en donde la secuencia de alfa-amilasa original se modifica en la posición 206 a Y, en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

50 En un aspecto particularmente preferido de la invención, la variante que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas de entre las grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en el que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, en el que las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6. En realizaciones preferidas, las al menos dos delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 se seleccionan del grupo que consiste en 181*+182*, 181*+183*, 182*+ 183*, 181*+184*, 182*+184* y 183*+184*.

55 En otro aspecto preferido de la invención, la variante comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde el padre alfa- La secuencia de amilasa está modificada en la posición 206 a Y, y comprende además una sustitución en una o más, o una o varias, posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

60 En un aspecto aún preferido de la invención, la variante que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas de entre las grupo que consta de 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en el que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionados del grupo formado por 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147,

149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 359, 418, 431, 434, 447, 458 en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

En un aspecto adicional, la variante comprende una sustitución en dos o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 235, 243, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434 y 447 y 458, en los que la secuencia de alfa-amilasa original es modificado en la posición 206 a Y, en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

En aún un aspecto adicional, la variante que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en dos o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 235, 243, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447 y 458, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

Preferiblemente, las variantes que comprenden alteraciones en una o más de las posiciones arriba identificadas tienen una mayor estabilidad en composiciones que comprenden un agente quelante, tal como un detergente, preferiblemente, en detergente líquido en comparación con la alfa-amilasa parental.

Por lo tanto, las variantes según la invención tienen en una realización preferida una estabilidad mejorada en comparación con su amilasa parental en presencia de uno o más agentes quelantes. En un aspecto preferido, las variantes según la invención tienen una mayor estabilidad en comparación con su amilasa parental en presencia de uno o más agentes quelantes y baja concentración de calcio. En otro aspecto preferido, las variantes según la invención tienen una estabilidad mejorada en comparación con su amilasa original en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0.

En un aspecto particular, la variante que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y que comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en los que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 338, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y en donde la variante tiene además al menos un 60 %, tal como al menos un 65 %, tal como al menos un 70 %, tal como al menos un 75 %, tal como al menos un 80 %, tal como al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, tal como al menos un 100 % de actividad residual en presencia de un agente quelante en el que dicho agente quelante en una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente por debajo de 9,5 mM, preferiblemente por debajo de 9 mM, preferiblemente por debajo de 8,5 mM, preferiblemente por debajo de 8 mM, preferiblemente por debajo de 7,5 mM, preferiblemente por debajo de 7 mM, preferiblemente por debajo de 6,5 mM, preferiblemente por debajo de 6 mM, preferiblemente por debajo de 5,5 mM, preferiblemente por debajo de 5 mM, preferiblemente por debajo de 4,5 mM, por debajo de 4 mM, preferiblemente por debajo de 3,5 mM, preferiblemente por debajo de 3 mM, preferiblemente por debajo de 2,5 mM, preferiblemente por debajo de 2 mM, preferiblemente por debajo de 1,5 mM o preferiblemente por debajo de 1 mM es capaz de reducir la concentración de calcio libre. iones de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0, como se describe a continuación y cuando la actividad residual se determina después de 18 horas a pH 8, a 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o el ensayo PNP-G7 descrito en "Materiales y Métodos". En realizaciones preferidas, las al menos dos deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 se seleccionan del grupo que consiste en 181*+182*, 181*+183*, 182*+ 183*, 181*+184*, 182*+184* y 183*+184*.

En otro aspecto particular, la variante comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificado en la posición 206 a Y, y que comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y en donde la variante tiene además al menos 60 %, tal como al menos el 65 % tal como al menos el 70 % tal como al menos el 75 % tal como al menos el 80 % tal como al menos el 85 % tal como al menos el 90 % tal como al menos el 95 % tal como al menos un 100 % de actividad residual o tiene una actividad residual que es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejorada en comparación con la actividad residual de la alfa-amilasa original en el presencia de un agente quelante en el que dicho agente quelante está en una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente por debajo de 6 mM, preferiblemente por debajo de 5,5 mM, preferiblemente por debajo de 5 mM, preferiblemente por debajo de 4,5 mM, por debajo de 4 mM, preferiblemente por debajo de 3,5 mM, preferiblemente por debajo de 3 mM, preferiblemente por debajo de 2,5 mM, preferiblemente por debajo de 2 mM, preferiblemente por debajo de 1,5. mM o preferiblemente por debajo de 1 mM es capaz de reducir la concentración de

iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y métodos” y cuando la actividad residual se determina después de 18 horas a pH 8. en presencia de DTPA a 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o el ensayo PNP-G7 descrito en “Materiales y métodos”.

Las variantes según la invención tienen la ventaja de ser más estables frente a los agentes quelantes fuertes en comparación con su alfa-amilasa parental; sin embargo, al mismo tiempo, han mantenido las propiedades de eficacia de la alfa-amilasa parental tal como la capacidad limpiadora o la capacidad de lavado de vajilla. En una realización preferida, las variantes según la invención tienen la ventaja de ser más estables frente a los agentes quelantes, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide en cloruro postásico 80 mM y EPPS 49 mM, a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos”. Estos agentes quelantes preferidos pueden seleccionarse, aunque no de forma restrictiva, de EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP, HEDP y mezclas de los mismos.

Por lo tanto, las variantes útiles en la invención tienen mayor estabilidad en presencia de agentes quelantes que unen iones metálicos, especialmente iones calcio, en comparación con su alfa-amilasa parental. En los detergentes es común incluir agentes quelantes debido al efecto ventajoso del proceso de lavado, pero la mayor estabilidad también puede ser aparente en condiciones en las cuales está presente el material vegetal que incluye agentes quelantes naturales, tales como fitato o citrato. En particular, un agente quelante fuerte competirá con las alfa-amilasas sensibles al calcio por los iones calcio y, en cierta medida, será capaz de privar a la alfa-amilasa de los iones calcio unidos en su estructura, dando lugar a la reducción de la estabilidad o actividad de la alfa-amilasa.

Por lo tanto, las variantes de la invención tienen una estabilidad y/o actividad mejoradas en presencia de agentes quelantes, tales como EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP, HEDP y mezclas de los mismos, en comparación con su alfa-amilasa parental.

Además de aumentar la estabilidad frente a los agentes quelantes en relación con la alfa-amilasa parental, las variantes de la presente invención mantienen o mejoran su capacidad limpiadora en comparación con la alfa-amilasa parental. La mejor capacidad limpiadora puede medirse en AMSA o en una prueba de capacidad limpiadora utilizando vasos de precipitados, tal como se describe en “Materiales y Métodos”.

Por lo tanto, en una realización particular de la invención la variante tiene al menos 70 % de actividad residual, preferiblemente al menos 75 % de actividad residual, preferiblemente al menos 80 % de actividad residual, preferiblemente al menos 85 % de actividad residual, preferiblemente al menos 90 % de actividad residual, preferiblemente al menos 95 % de actividad residual, o tiene una actividad residual que es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejor comparada con la actividad residual de la alfa-amilasa original, cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8 y 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 (descrito en “Materiales y Métodos”) en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe a continuación y en donde la variante tiene una capacidad limpiadora al menos 40 %, tal como al menos 50 %, tal como al menos 55 %, tal como al menos 60 %, tal como al menos 65 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 100 % mejor comparada con la alfa-amilasa original cuando se mide en AMSA o en un ensayo de la capacidad limpiadora utilizando vasos de precipitados como se describe en “Materiales y Métodos”.

En un aspecto preferido de la invención, la composición comprende una variante que tiene al menos 60 %, tal como al menos 65 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 100 % de actividad residual en comparación con la alfa-amilasa original en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en el ejemplo 2a, y cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8, a 31 °C, como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 descrito en “Materiales y Métodos”.

Por lo tanto, en un aspecto particular de la invención, la composición comprende un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en: agentes quelantes que contienen fósforo, que no contienen fósforo, que contienen nitrógeno o que no contienen nitrógeno, los agentes quelantes preferidos son EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP y HEDP y mezclas de los mismos.

En un aspecto preferido, las variantes según la invención tienen una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 86 %, preferiblemente al menos 87 %, preferiblemente al menos 88 %, preferiblemente al menos 89 %, preferiblemente al menos 90 %, preferiblemente al menos 91 %, preferiblemente al menos 92 %, preferiblemente al menos 93 %, preferiblemente al menos 94 %, preferiblemente al menos 95 %, preferiblemente al menos

96 %, preferiblemente al menos 97 %, preferiblemente al menos 98 %, preferiblemente al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original.

En un aspecto de la presente invención, las variantes de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en uno o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 85 %, preferiblemente de al menos 86 %, preferiblemente de al menos 87 %, preferiblemente de al menos 88 %, preferiblemente de al menos 89 %, especialmente preferido al menos el 90 %, preferido al menos el 91 %, preferido al menos el 92 %, preferido al menos el 93 %, preferido al menos el 94 %, preferido al menos el 95 %, preferido al menos el 96 %, preferido al menos el 97 %, preferido al menos 98 %, preferiblemente al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original.

En un aspecto adicional de la presente invención, la variante comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consta de 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en el que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 85 %, preferiblemente de al menos 86 %, preferiblemente de al menos 87 %, preferiblemente de al menos 88 %, preferiblemente de al menos 89 %, especialmente preferido de al menos 90 %, preferido al menos 91 %, preferido al menos 92 %, preferido al menos 93 %, preferido al menos 94 %, preferido al menos 95 %, preferido al menos 96 %, preferido al menos 97 %, preferido al menos 98 %, preferido al menos un 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º6.

En otro aspecto de la invención, la variante comprende una sustitución en una o más posiciones 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 o 243, en la que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y una sustitución en una o más posiciones 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 85 %, preferiblemente al menos 86 %, preferiblemente al menos 87 %, preferido al menos 88 %, preferido al menos 89 %, especialmente preferido al menos 90 %, preferido al menos 91 %, preferido al menos 92 %, preferido al menos 93 %, preferido al menos 94 %, preferido al menos 95 %, preferido al menos 96 %, preferido al menos 97 %, preferido al menos 98 %, preferido al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original.

En otro aspecto de la invención, la variante comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en una o más posiciones 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 o 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y una sustitución en una o más posiciones 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 85 %, preferiblemente de al menos 86 %, preferiblemente de al menos 87 %, preferiblemente de al menos 88 %, preferiblemente de al menos 89 %, especialmente preferido de al menos 90 %, preferido al menos 91 %, preferido al menos 92 %, preferido al menos 93 %, preferido al menos 94 %, preferido al menos 95 %, preferido al menos 96 %, preferido al menos 97 %, preferido al menos 98 %, preferido al menos al menos un 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original.

En un aspecto, el número de sustituciones de aminoácidos en las variantes de la presente invención es inferior a 10 sustituciones, tal como inferior a 9 sustituciones, tal como inferior a 8 sustituciones, tal como inferior a 7 sustituciones, tal como inferior a 6 sustituciones, tal como inferior a 5 sustituciones, tal como menos de 4 sustituciones, tal como menos de 3 sustituciones, tal como menos de 2 sustituciones, y/o en donde el número de delecciones es inferior a 10 delecciones, tal como menos de 9 delecciones, tal como menos de 8 delecciones, tal como menos de 7 delecciones, tal como menos de 6 delecciones, tal como menos de 5 delecciones, tal como menos de 4 delecciones, tal como menos de 3 delecciones, tal como menos de 2 delecciones, tal como menos de 1 eliminación o la variante puede no comprender delecciones y/o en donde el número de inserciones está por debajo de 10 inserciones, por ejemplo por debajo de 9 inserciones, por ejemplo por debajo de 8 inserciones, por ejemplo por debajo de 7 inserciones, por ejemplo por debajo de 6 inserciones, por ejemplo por debajo de 5 inserciones, por ejemplo por debajo de 4 inserciones, por ejemplo por debajo de 3 inserciones, por ejemplo menos de 2 inserciones, tal como menos de 1 inserciones o la variante puede no comprender inserciones en comparación con la alfa-amilasa original.

En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 193. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 193 con [G, A, T o M] del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6. En una realización particular, la variante comprende la sustitución V206Y del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución S193T.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 195, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 195 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 195, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución N195F, en la que el padre es el polipéptido maduro con la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende Y como una sustitución en la posición 195. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución N195Y.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 195, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 195 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 195, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución N195F. En otro aspecto, la variante comprende Y como una sustitución en la posición 195. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución N195Y.

La variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 197, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 197 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 197, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución N197F, en donde el progenitor es cualquiera de los polipéptidos maduros con la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende L como una sustitución en la posición 197. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución N197L.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 197, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 197 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 197, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución N197F, en donde el progenitor adre es cualquiera de los polipéptidos maduros con la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende L como una sustitución en la posición 197. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución N197L.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 198, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 198 con [Q, N, D, E, R, K o H], en otro En un aspecto preferido, la variante comprende N en la posición 198, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución Y198N.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 198, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 198 con [Q, N, D, E, R, K o H], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 198, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución Y198N.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 200, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 200 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 200, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución Y200F.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 200, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 200 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 200, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución Y200F.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 203, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 203 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 203, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución Y203F.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 203, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 203 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución Y203F. En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y además comprende Y en la posición 206.

En una realización particular, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución V206Y del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 210, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 210 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende Y en la posición 210, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución H210Y.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 210, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 210 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende Y en la posición 210, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución H210Y.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 212, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 212 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende V en la posición 212, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución E212V.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 212, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 212 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende V en la posición 212, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución E212V.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 213, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 213 con [G, A, S, T o M], en otro aspecto preferido, la variante comprende A en la posición 213, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución V213A.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 213, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 213 con [G, A, S, T o M], en otro aspecto preferido, la variante comprende A en la posición 213, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución V213A.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en la posición 243, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 243 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 243, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución Y243F.

En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 243, en una En un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 243 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende A en la posición 243, en otro aspecto preferido más, la variante comprende la sustitución Y243F.

En otro aspecto, la variante comprende sustituciones en las posiciones 193 y 195. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones en las posiciones 193 y 195 con [F, W, Y, L, I, V, N, G, A, T, M o Q]. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones T y F en las posiciones 193 y 195, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S193T + N195F del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende T e Y como sustituciones en las posiciones 193 y 195, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S193T + N195Y del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

En otro aspecto la variante de una alfa-amilasa original comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 193 y 195. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 193 y 195 con [F, W, Y, L, I, V, N, G, A, T, M o Q]. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones T y F en las posiciones 193 y 195, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones S193T + N195F del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende T e Y como sustituciones en las posiciones 193 y 195, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones S193T + N195 del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende una sustitución en las posiciones 195 y 198, utilizando la numeración de la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 195 y 198 con [F, W, Y, L, I, V, N o Q]. En otro aspecto, la variante comprende F y N como sustituciones en las posiciones 195 y 198, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + Y198N, en donde la original es cualquiera de los polipéptidos maduros de la Id. de sec. n.º: 6, 8, 10 o 12. En otro aspecto, la

variante comprende Y y N como sustituciones en las posiciones 195 y 198, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + Y198N.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en las posiciones 195 y 198, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 198 con [F, W, Y, L, I, V, N o Q]. En otro aspecto, la variante comprende F y N como sustituciones en las posiciones 195 y 198, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + Y198N. En otro aspecto, la variante comprende Y y N como sustituciones en las posiciones 195 y 198, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + Y198N.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende una sustitución en las posiciones 195 y 206, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en la posición 206 con Y en la posición 195 con [F, W, Y, V, I, L, C, N, S, T, D, E o H]. En otro aspecto, la variante comprende F y L como sustituciones en la posición 195. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + V206Y. En otro aspecto, la variante comprende Y y L como sustituciones en 195. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + V206Y.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 206, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 195 con [F, W, Y, V, I, L, C, N, S, T, D, E o H]. En otro aspecto, la variante comprende F y L como sustituciones en la posición 195. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + V206 Y del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende Y y L como sustituciones en la posición 195. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + V206 Y del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende sustituciones en las posiciones 195 y 210, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 195 y 210 con [F, W, Y, V, I, L, C, N, S, T o H]. En otro aspecto, la variante comprende F y Y como sustituciones en 195 y 210, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + H210Y en donde el progenitor es cualquiera de los polipéptidos maduros con la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende Y como sustitución en las posiciones 195 y 210. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + H210Y, en donde la alfa-amilasa original es cualquiera de los polipéptidos maduros con la Id. de sec. n.º: 6.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 210, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 210 con [F, W, Y, V, I, L, C, N, S, T, o H]. En otro aspecto, la variante comprende F y Y como sustituciones en 195 y 210, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F +. En otro aspecto, la variante comprende Y como sustitución en las posiciones correspondientes a las posiciones 195 y 210. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + H210Y.

En otro aspecto, la alfa-amilasa parental variante comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 198 y 206, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones en las posiciones 198 y 206 con [N, Q, L, I, F, Y, C, N, S, T, D, E o H]. En otro aspecto, la variante comprende N y [F o Y] como sustituciones en las posiciones 198 y 206, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y198N + V206 [F, Y, L, H o N] del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

En otro aspecto, la alfa-amilasa parental variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 198 y 206, utilizando la numeración según id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución en la posición 206 con Y y en 198 con Y. En este aspecto, la variante comprende N y [F o Y] como sustituciones en las posiciones 198. En otro aspecto, la variante comprende al menos una,

al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones Y198N + V206 Y.

5 En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende sustituciones en las posiciones 206 y 213, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6.

10 En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en 206 con Y y en la posición 213 con [D, E, L, I, V, F, Y, W, G, A, S, T o M]. En otro aspecto, la variante comprende [F o Y] y A como sustituciones en la posición 210, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones V206Y+V213A.

15 En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 206 y 213, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6.

20 En otro aspecto la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en la posición 206 con Y y en la posición 213 con [D, E, L, I, V, F, Y, W, G, A, S, T o M]. En otro aspecto, la variante comprende [F o Y] y A como sustituciones en las posiciones 206 y 210. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones V206 Y, V213A del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

25 En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende sustituciones en las posiciones 195 y 243, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 195 y 243 con [F, W, Y, L, I o V]. En otro aspecto, la variante comprende F como sustituciones en las posiciones 195 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + Y243F. En otro aspecto, la variante comprende Y y F como sustituciones en las posiciones 195 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + Y243F.

30 En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 195 y 243. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 243 con [F, W, Y, L, I o V]. En otro aspecto, la variante comprende F como sustituciones en las posiciones 195 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + Y243F. En otro aspecto, la variante comprende Y y F como sustituciones en las posiciones 195 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + Y243F.

40 En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende sustituciones en las posiciones 206 y 243, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en la posición 206 con Y y en la posición 2423 con [H, D, E, N, F, W, Y, L, I o V]. En otro aspecto, la variante comprende L y F como sustituciones en 243. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones V206Y + Y243F.

45 En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 206 y 243, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en 206 con Y y en las posiciones 243 con [H, D, E, N, F, W, Y, L, I o V]. En otro aspecto, la variante comprende L y F como sustituciones en la posición 243. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones V206Y + Y243F.

55 En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende sustituciones en las posiciones 193, 195 y 197, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 193, 195 y 197 con [F, W, Y, L, I o V]. En otro aspecto, la variante comprende T y F como sustituciones en posiciones correspondientes a las posiciones 193, 195 y 197, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S193T + N195F + N197F. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones T, F y L en las posiciones 193, 195 y 197, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S193T + N195F + N197L. En otro aspecto, la variante comprende T, Y y F como sustituciones en posiciones correspondientes a las posiciones 193, 195 y 197, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S193T + N195Y + N197F. En otro aspecto, la variante comprende T, Y y L como sustituciones en posiciones correspondientes a las posiciones 193, 195 y 197, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S193T + N195Y + N197L.

En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 193, 195 y 197, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 193, 195 y 197 con [F, W, Y, L, I o V]. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones T y F en las posiciones 193, 195 y 197, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones S193T + N195F + N197L. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones S193T + N195F + N197L. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones T, Y y F en las posiciones 193, 195 y 197, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones S193T + N195Y + N197F. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones T, Y y L en las posiciones 193, 195 y 197, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones S193T + N195Y + N197L.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones en 206 con Y y en las posiciones 195 y 243 con [D, E, L, I, F, V, Y, C, N, S, T o H]. En otro aspecto, la variante comprende F, Y y F como sustituciones en las posiciones 195 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + V206Y + Y243F. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones Y, Y y F en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + V206Y + Y243F.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución Y en la posición 206 y en las posiciones 195 y 243 con [D, E, L, I, F, V, Y, C, N, S, T o H]. En otro aspecto, la variante comprende F, L y F como sustituciones en las posiciones 195 y 243, respectivamente.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa original comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en la posición 206 con Y y en las posiciones 195 y 243 con [D, E, L, I, F, V, Y, C, N, S, T o H]. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones F, Y y F como sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + V206Y + Y243F. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + I206Y + Y243F. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones Y, Y y F en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + V206Y + Y243F.

En un aspecto de la invención, la variante que comprende V206Y y al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y una o más de las siguientes sustituciones N195 [F, o Y], N197 [F o L], Y198N, Y200F, Y203F, H210Y, E212 [V o G], V213A o Y243F y una sustitución en una o más posiciones I116T, Q129L, G133E, E134Y, K142R, P146S, G147E, G149R, N151R, Y152H, Q169E, Q174R, A186R, S244Q, G303V, K320N, R359I, N418D, A447V de la secuencia polipeptídica madura de la Id. de sec. n.º: 6.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a composiciones que comprenden variantes de una alfa-amilasa original que comprende una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243. en el que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y que comprende además una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 en los que

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo de la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º: 6.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a variantes de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consta de 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 243, en el que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y que comprende además una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo formado por 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 en donde

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º: 6.

Preferiblemente, la variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 90 %, con la máxima preferencia al menos 95 %, e incluso con la máxima preferencia al menos aproximadamente 97 % a la secuencia de aminoácidos de una de la Id. de sec. n.º: 6.

Preferiblemente, las variantes que comprenden alteraciones en una o más de las posiciones arriba identificadas tienen una mayor estabilidad en detergente, preferiblemente, en detergente líquido, en comparación con la alfa-amilasa parental.

Los inventores han descubierto que estas variantes tienen una estabilidad mejorada en comparación con la alfa-amilasa original en composiciones que comprenden un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de los iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, a 21 °C y pH 8,0, como se describe en "Materiales y Métodos".

Por lo tanto, también se describe para la información un método para preparar un polipéptido que comprende;

(a) proporcionar una secuencia de aminoácidos de un polipéptido original que tiene actividad amilasa;

(b) seleccionar uno o más aminoácidos que ocupan una o más posiciones correspondientes a las posiciones 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y seleccionar además una o más posiciones correspondientes a las posiciones 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6;

(c) modificar la secuencia sustituyendo o eliminando el residuo de aminoácido seleccionado o insertando uno o más residuos de aminoácidos corriente abajo y en posición adyacente al residuo de aminoácido seleccionado;

(d) producir un polipéptido variante que tiene la secuencia modificada;

(e) someter a prueba al polipéptido variante para analizar la actividad de amilasa y la estabilidad; y

(f) seleccionar un polipéptido variante que tiene actividad amilasa y mayor estabilidad con respecto al polipéptido original en presencia de un agente quelante en el que dicho agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0.

Preferiblemente, las variantes comprenden alteraciones en tres posiciones, más preferiblemente cuatro posiciones, incluso más preferiblemente cinco posiciones y lo más preferiblemente seis posiciones, en una realización particularmente preferida la variante comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y además una o más sustituciones en una o más posiciones correspondientes a posiciones en la alfa-amilasa original seleccionada del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y (usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6).

Por lo tanto, un aspecto preferido se refiere a una variante de una alfa-amilasa original que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184, una alteración en una o más posiciones seleccionadas de el grupo que consiste en 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 243, en el que la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y que comprende además una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo formado por 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 donde

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º: 6.

En una realización preferida, la alfa-amilasa variante tiene una o más (varias) delecciones y/o sustituciones y/o inserciones de aminoácidos. En una realización especialmente preferida, las alfa-amilasas variantes incluyen una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 6 en el presente documento y que comprende además la siguiente modificación: D183*+G184* (delección en la posición 183 y 184), esta variante muestra un buen rendimiento en detergentes y tienen una estabilidad mejorada en presencia de agentes quelantes.

En otra realización preferida, la alfa-amilasa variante comprende SP722 (Id. de sec. n.º 6), incluida cualquiera de SP722+R181* G182*, SP722+G182* D183*, SP722+D183* G184*.

"SP722+R181* G182*" significa que la alfa-amilasa SP722 de *Bacillus spp.* se ha mutado mediante delecciones en las posiciones R181 y G181, en donde los números corresponden a la Id. de sec. n.º: 6.

A continuación, en las composiciones de la invención sólo se utilizan las variantes que cumplen la definición proporcionada por la reivindicación 1.

Por lo tanto, en un aspecto, la alfa-amilasa variante comprende: SP722 que incluye cualquiera de:

SP722 + R181*G182*, SP722+G182*+ D183*, SP722 + D183*+ G184*; SP722 + R181*G182* N195F; SP722 + G182* D183* N195F; SP722 + D183* G184* N195F; SP722 + R181*G182* M202L; SP722 + G182* D183* M202L; SP722 + D183* G184* M202L; SP722 + R181* G182* N195F M202L; SP722 + G182 D183* N195F M202L SP722 + D183* G184* N195F M202L; SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F;

SP722 + R181* G182* R181Q; SP722 + G182* D183* R181Q; SP722+D183* G184* R181Q; SP722+R181* G182* L118K N195F H458K; SP722+G182* D183* L118K N195F H458K; SP722+D183* G184* L118K N195F H458K;

"SP722 + R181* G182* N195F" significa que la alfa-amilasa de *Bacillus spp.* se ha mutado como sigue: delecciones en las posiciones R181 y G181 y una sustitución de Asn (N) a Phe (F) en la posición 195, en donde la numeración corresponde a la Id. de sec. n.º: 6 (contando como si las posiciones delecionadas todavía están presentes, es decir la numeración no se reduce en dos al deleccionar dos posiciones).

En una realización especialmente preferida de la invención, las alteraciones se seleccionan de las siguientes sustituciones, X206Y, preferiblemente V206Y, y;

X193A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente S193T;

X195A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente N195 [F o Y];

X197A,C,D,E,F,G,H,I,K,L, N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente N197 [F o L]

X198A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente Y198N;

X200A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente Y200F;

X203A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,X,Y, preferiblemente Y203F.

X210A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente H210Y;

X212A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente E212 [V o G]; y

X213A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,X,Y, preferiblemente V213A;

X243A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Y243F.

En otra realización preferida, las variantes comprenden alteraciones en tres posiciones, más preferiblemente cuatro posiciones, más preferiblemente cinco posiciones y más preferiblemente seis posiciones, en una realización particularmente preferida la variante comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y además una alteración en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original está modificada en la posición 206 a Y, y una alteración en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 129, 133, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 243, 244, 303, 320, 359, 418, 447 (usando numeración según la Id. de sec. n.º: 6)

Por lo tanto, en una realización especialmente preferida de la invención, las alteraciones se seleccionan de las siguientes sustituciones:

X116A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente N116T

X118A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente R118K

X129A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y, preferiblemente Q129L

X133A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,preferiblemente G133E

X134A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente D134Y

X142A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente K142R

X146A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente P146S

X147A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y, preferiblemente G147E

X149A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente G149R

X151A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente T151R

X152A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Y152H

X169A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Q169E

X174C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Q174R

X186A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y, preferiblemente A186R

X235A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente I235N

X243A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Y243F

X244A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente S244Q

X303A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente G303V

X320A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente K320N

X339A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente S339P

X359C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente R359I

X418A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente N418D

X431A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente S431T

X434A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente P434T

X447A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,preferiblemente A447V

X458A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente R458K

5

En una realización particular preferida, la variante comprende además al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184.

10

En una realización preferida, el número de sustituciones de aminoácidos en las variantes es preferiblemente 17 sustituciones, más preferiblemente 16 sustituciones, más preferiblemente 15 sustituciones, más preferiblemente 14 sustituciones, más preferiblemente 13 sustituciones, más preferiblemente 12 sustituciones, más preferiblemente 11 sustituciones, más preferiblemente 10 sustituciones, más preferiblemente 9 sustituciones, más preferiblemente 8 sustituciones, más preferiblemente 7 sustituciones, más preferiblemente 6 sustituciones, más preferiblemente 5 sustituciones, más preferiblemente 4 sustituciones, incluso más preferiblemente 3 sustituciones y lo más preferiblemente 2 sustituciones. En otra realización preferida, el número de sustituciones de aminoácidos en las variantes de la presente invención consiste en preferiblemente 17 sustituciones, más preferiblemente 16 sustituciones, más preferiblemente 15 sustituciones, más preferiblemente 14 sustituciones, más preferiblemente 13 sustituciones, más preferiblemente 12 sustituciones, más preferiblemente 11 sustituciones, más preferiblemente 10 sustituciones, más preferiblemente 9 sustituciones, más preferiblemente 8 sustituciones, más preferiblemente 7 sustituciones, más preferiblemente 6 sustituciones, más preferiblemente 5 sustituciones, más preferiblemente 4 sustituciones, aún más preferiblemente 3 sustituciones y lo más preferiblemente 2 sustituciones.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En una realización particular preferida, las variantes comprenden una combinación de diferentes alteraciones. Por tanto, en una realización preferida, la variante según la presente invención comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184, preferiblemente la delección en la posición 183 y 184 y comprende además una de las siguientes combinaciones de alteraciones y sustituciones en las posiciones 186 y 195; sustituciones en las posiciones 174 y 212; sustituciones en las posiciones 206 y 212; sustituciones en las posiciones 206, 212 y 304; sustituciones en las posiciones 206, 212, 304 y 447; sustituciones en las posiciones 116 y 133; sustituciones en las posiciones 235 y 339; sustituciones en las posiciones 193 y 206; sustituciones en las posiciones 116, 133 y 142; sustituciones en las posiciones 116, 133, 142 y 198; sustituciones en las posiciones 116, 133, 142, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 133 y 195; sustituciones en las posiciones 133, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 133, 195, 198 y 200; sustituciones en las posiciones 116 y 195; sustituciones en las posiciones 116, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 142 y 146; sustituciones en las posiciones 142, 146 y 149; sustituciones en las posiciones 142, 146, 149 y 195; sustituciones en las posiciones 142, 146, 149, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 142, 146, 149, 195, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 151 y 210; sustituciones en las posiciones 151, 210 y 320; sustituciones en las posiciones 186, 195, 212 y 213; sustituciones en las posiciones 151, 210, 320 y 359; sustituciones en las posiciones 151, 210, 320, 359 y 418; sustituciones en las posiciones 147 y 149; sustituciones en las posiciones 147, 149 y 169; sustituciones en las posiciones 147, 149, 169 y 198; sustituciones en las posiciones 147, 149, 169, 198 y 203; sustituciones en las posiciones 147, 149, 169, 198, 203 y 206; sustituciones en las posiciones 133 y 149; sustituciones en las posiciones 133, 149 y 195; sustituciones en las posiciones 133, 149, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 133, 149, 195, 198 y 203; sustituciones en las posiciones 147 y 152; sustituciones en las posiciones 147, 152 y 169; sustituciones en las posiciones 147, 152, 169 y 198; sustituciones en las posiciones 147, 152, 169, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 195 y 206; sustituciones en las posiciones 195 y 210; sustituciones en las posiciones 206 y 210; sustituciones en las posiciones 186 y 195; sustituciones en las posiciones 195 y 206; sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243; sustituciones en las posiciones 206 y 243; sustituciones en las posiciones 133 y 149; sustituciones en las posiciones 133, 149 y 198; sustituciones en las posiciones 133, 149, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 116 y 133; sustituciones en las posiciones 116, 133 y 147; sustituciones en las posiciones 116, 133, 147 y 152; sustituciones en las posiciones 116, 133, 147, 152 y 198; sustituciones en las posiciones 116, 133, 147, 152, 198 y 203; sustituciones en las posiciones 116, 116, 133, 147, 152, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 147 y 149; sustituciones en las posiciones 147, 149 y 195; sustituciones en las posiciones 147, 149, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 147, 149, 195, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 133 y 142; sustituciones en las posiciones 133, 142 y 195; sustituciones en las posiciones 133, 142, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 133 y 149; sustituciones en las posiciones 133, 149 y 152; sustituciones en las posiciones 133, 149, 152 y 195; sustituciones en las posiciones 133, 149, 152, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 133, 149, 152, 195, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 116 y 129; sustituciones en las posiciones 116, 129 y 142; sustituciones en las posiciones 116, 129, 142 y 195; sustituciones en las posiciones 116, 129, 142, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 116, 129, 142, 195, 198 y 203; sustituciones en las posiciones 116, 116, 129, 142, 195, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 133 y 149; sustituciones en las posiciones 133, 149 y 152; sustituciones en las posiciones 133, 149, 152 y 195; sustituciones en las posiciones 133, 149, 152, 195 y 198; sustituciones en las posiciones 133, 149, 152, 195, 198 y 203; sustituciones en las posiciones 133, 116, 149, 152, 195, 198 y 206; sustituciones en las posiciones 116 y 133; sustituciones en las posiciones 116, 133 y 149; sustituciones en las posiciones 116, 133, 149 y 198; sustituciones en las posiciones 116, 133, 149, 198 y 203; sustituciones en las posiciones 116, 133, 149, 198, 203 y 206; sustituciones en las posiciones 195 y 198; sustituciones en las posiciones 195, 198 y 203; sustituciones en las posiciones 195, 198, 203 y 206; sustituciones en las posiciones 133, 149, 195, 203 y 206.

En otra realización particular preferida, las variantes comprenden una combinación de diferentes alteraciones. Por tanto, en otra realización preferida particular, la variante según al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184, preferiblemente delección en la posición 183 y 184, y que comprenden además una de las siguientes combinaciones de alteraciones y sustituciones en las posiciones 186 con [R, T, K, H, E, D, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 174 con [R, K, H, E, D, Q o N] y 212 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 con [D, E, F, W, Y, L, I, V, N, Q o H] y 212 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H], 212 con [F, W, Y, L, I o V] y 304 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H], 212 con [F, W, Y, L, I o V], 304 con [F, W, Y, L, I o V] y 447 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 235 con [N o L] y 339 con [P]; sustituciones en las posiciones 193 con [G, A, T o M] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D] y 142 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 142 con [R, K, H, Q o N] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 142 con [R, K, H, Q o N], 198 con [Q o N] con [Q o N] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 186 con [R, T, K, H, E, D, Q, o N], 195 con [F, W, Y, L, I, o V], 212 con [F, W, Y, L, I, o V] y 213; con [A]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 200 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N] y 146 con [G, A, S, T o M]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N], 146 con [G, A, S, T o M] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N], 146 con [G, A, S, T o M], 149 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N], 146 con [G, A, S, T o M], 149 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N], 146 con [G, A, S, T o M], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; y 206 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 151 y 210 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 151, 210 con [F, W, Y, L, I o V] y 320 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 151, 210 con [F, W, Y, L, I o V], 320 con [Q o N] y 359 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 151, 210 con [F, W, Y, L, I o V], 320 con [Q o N], 359 con [F, W, Y, L, I o V] y 418 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 169 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D], 198 con [Q o N], 203 con [F, W, Y, L, I o V] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D] y 152 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N] y 169 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D], 198 con [Q o N] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 206 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 210 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 186 con [R, K, H, E, D, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q, o H]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V], 206 y 243 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 y 243 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D] y 147 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D], 147 con [E o D] y 152 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V] y 206; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 206; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 142 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 142 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 142 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 152 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 152 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 152 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 152 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 152 con [R, K, H, Q o N]

H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N] y 206; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 129 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 129 con [F, W, Y, L, I o V] y 142 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 129 con [F, W, Y, L, I o V], 142 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 129 con [F, W, Y, L, I o V], 142 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 129 con [F, W, Y, L, I o V], 142 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 129 con [F, W, Y, L, I o V], 142 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N], 203 con [F, W, Y, L, I o V] y 206; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 152 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 152 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 152 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 152 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V] 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 152 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N], 203 con [F, W, Y, L, I o V] y 206; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] con [R, K, H, Q o N] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 198 con [Q o N], 203 con [F, W, Y, L, I o V] y 206; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N], 203 con [F, W, Y, L, I o V] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I, o V], 203 con [F, W, Y, L, I, o V], y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q, o H].

Las variantes útiles particulares incluyen (usando la numeración de la Id. de sec. n.º: 6):

D183* G184* H210Y; D183* G184* V206Y; N116T G133E K142R D183* G184* Y198N V206Y; G147E G149R Q169E D183* G184* Y198N Y203F V206Y; G133E G149R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206Y; G147E Y152H Q169E D183* G184* Y198N V206Y; D183* G184* N195F V206Y; D183* G184* V206Y H210Y; D183* G184* N195F V206Y Y243F; D183* G184* N195F V206Y Y243F; D183* G184* V206Y Y243F; G133D G149R D183* G184* Y198N V206Y; N116T G133E G147E Y152H D183* G184* Y198N Y203F V206Y; G147E G149R D183* G184* N195F Y198N V206Y; G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N V206Y; N116T Q129L K142R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206Y; G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206Y; N116T G133E G149R G182* D183* Y198N Y203F V206Y.

En una realización preferida, las variantes incluyen,

SP722 + D183* G184* V206Y; SP722 + D183* G184* V206L, SP722 + D183* G184* V206Y E212G G304V A447V; SP722 + N116T G133E K142R D183* G184* Y198N V206Y; SP722 + G147E G149R Q169E D183* G184* Y198N Y203F V206Y; SP722 + G133E G149R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206Y; SP722 + G147E Y152H Q169E D183* G184* Y198N V206Y; SP722 + D183* G184* N195F V206Y; SP722 + D183* G184* V206Y H210Y; SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F; SP722 + D183* G184* V206Y Y243F; SP722 + G133D G149R D183* G184* Y198N V206Y; SP722 + N116T G133E G147E Y152H D183* G184* Y198N Y203F V206Y; SP722 + G147E G149R D183* G184* N195F Y198N V206Y; SP722 + G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N V206Y; SP722 + N116T Q129L K142R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206Y; SP722 + G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206Y; SP722 + N116T G133E G149R G182* D183* Y198N Y203F V206Y.

En una realización preferida, las variantes se seleccionan de las siguientes: SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F; SP722 + D183* G184* N195F V206Y.

Composiciones limpiadoras

La presente invención preferiblemente se refiere a productos y/o métodos relacionados con y/o usados según las composiciones reivindicadas que son para el cuidado del aire, cuidado del coche, lavado de vajillas, acondicionado de telas (incluido el suavizado) detergencia de telas, aditivos para lavado y enjuagado y/o cuidado de ropa, limpieza y/o tratamiento de superficies duras, y otra limpieza para uso del consumidor o institucional. Según la invención, las variantes de alfa-amilasa anteriores pueden ser normalmente un componente en una composición de limpieza tal como una composición detergente, por ejemplo, una composición detergente para lavado de ropa o una composición detergente para lavado de vajillas. Es especialmente preferida una composición detergente para lavado de ropa líquida.

Dichas composiciones limpiadoras comprenden un adyuvante de limpieza/ detergente, que no es un agente quelante según se ha definido anteriormente, preferiblemente que comprende una mezcla de componentes. De forma típica, el adyuvante limpiador estará presente en la composición en una cantidad de 0,001 a 99,9 % en peso, de forma más típica de 0,01 a 80 % en peso de adyuvante de limpieza. Los adyuvantes limpiadores adecuados comprenden:

tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, blanqueadores, catalizadores del blanqueador, colorantes, reforzadores del blanqueador, agentes de transferencia de colorantes, adyuvantes de deposición, tensioactivos, enzimas adicionales, y estabilizantes de enzimas, materiales catalíticos, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, abrillantadores ópticos, fotoactivadores, fluorescentes, agentes matizadores de tejidos, acondicionadores de tejidos, perácidos preformados, tensioactivos poliméricos, agentes de eliminación/anti-redeposición de manchas de arcilla, sales de carga, hidrótrofos, abrillantadores, supresores de jabonaduras, agentes elasticadores de estructuras, suavizantes de tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes antiencogimiento, germicidas, fungicidas, agentes contra el deslustre, agentes anticorrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, vehículos, auxiliares de procesamiento, pigmentos, tintes, perfumes y agentes de control del pH. Por ejemplo, estos pueden incluir ingredientes blanqueadores tales como un reforzador del blanqueador de imina; fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato y/o perborato, especialmente percarbonato recubierto con un material tal como una sal de carbonato y/o de sulfato, sal de silicato, borosilicato, y cualquier mezcla de los anteriores; perácido preformado, incluido perácido preformado en forma encapsulada; catalizadores de metales de transición; supresores de jabonaduras o sistemas supresores tales como supresores de jabonaduras basados en silicona y/o supresores de jabonaduras basados en ácidos grasos; suavizantes de telas tales como arcilla, silicona y/o compuestos de amonio cuaternario; floculantes tales como poli(óxido de etileno); inhibidores de transferencia de colorantes tales como polivinilpirrolidona, poli(N-óxido de 4-vinilpiridina) y/o copolímero de vinilpirrolidona y vinilimidazol; componentes para la integridad de telas tales como oligómeros producidos por la condensación de imidazol y epíclorhidrina; dispersantes de la suciedad y coadyuvantes antirredeposición de suciedad tales como poliaminas alcoxiladas y polímeros de etilenimina etoxilada; componentes antirredeposición, tales como poliésteres; polímeros de carboxilato tales como polímeros de ácido maleico o copolímeros de ácido maleico y acrílico; perfumes tales como microcápsulas de perfume; acordes encapsulados en almidón, perfumes depositados mediante pulverización; anillos de jabón; partículas estéticas; tintes; cargas como sulfato sódico, aunque se prefiere que la composición esté prácticamente exenta de cargas; sal de silicato como el silicato de sodio, incluidos el silicato de sodio 1.6R y 2.0R, o metasilicato sódico; copolímeros de ácidos dicarboxílicos y dioles; polímeros celulósicos como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa u otras celulosas alquílicas o alquilalcoxílicas; disolventes tales como 1,2-propanodiol, monoetanolamina; dietilenglicol, etanol y cualquier mezcla de los anteriores; hidrótrofos tales como cumenosulfonato de sodio, xilenosulfonato de sodio, toluenosulfonato de sodio, y cualquiera de sus mezclas; ácidos orgánicos tales como ácido cítrico; y cualquier combinación de los mismos.

En otro aspecto preferido, la composición comprende uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluidos los tensioactivos semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o de ion híbrido y/o anfóteros y/o no iónicos semipolares y/o mezclas de los mismos. Los tensioactivos están presentes de forma típica a un nivel de 0,1 % a 60 % en peso o de 0,5 a 50 % en peso o 1 a 40 % en peso de la composición.

Cuando se incluyen en la anterior, la composición limpiadora contendrá normalmente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % de un tensioactivo aniónico tal como un alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, alquilsulfato (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcanosulfonato secundario, éster metílico de alfa-sulfoácido graso, ácido alquil o alquenilsuccínico o jabón.

Cuando se incluyen en la anterior, el agente limpiador contendrá normalmente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 40 % de un tensioactivo no iónico tal como un alcohol etoxilado, nonilfenol etoxilado, alquilpoliglicósico, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso polihidroxiado, o derivados de N-acilo y N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

La composición limpiadora puede comprender una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica, por ejemplo, otra alfa-amilasa, glucoamilasa, amilasa maltofénica, CGTasa y/o una celulasa, mananasa (tal como MANNAWAY™ de Novozymes, Dinamarca), pectinasa, pectato liasa, cutinasa, y/o lacasa.

En general, las propiedades de la enzima o enzimas seleccionadas deberán ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimático, etc.), y la enzima o enzimas deberán estar presentes en una cantidad eficaz.

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

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

(b) proteasas de tipo tripsina o de tipo quimotripsina, tales como tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) incluidas la proteasa de *Fusarium* descrita en el documento WO 89/06270 y las proteasas de quimotripsina derivadas de *Cellulomonas* descritas en los documentos WO 05/052161 y WO 05/052146.

- 5 (c) metaloproteasas, incluidas las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* descritas en el documento WO 07/044993A2.

Las proteasas preferidas incluyen las derivadas de *Bacillus gibsonii* o *Bacillus lentus*.

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

- 20 Lipasas: Las lipasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois y col. (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* (JP-64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

- 30 La lipasa puede ser una "lipasa de primer ciclo" tal como la descrita en US-6.939.702 B1 y US-PA 2009/0217464. En un aspecto, la lipasa es una lipasa de primer lavado, preferiblemente una variante de la lipasa natural procedente de *Thermomyces lanuginosus* que comprenden las mutaciones T231R y N233R. La secuencia natural tiene los 269 aminoácidos (aminoácidos 23 – 291) del número de registro Swissprot Swiss-Prot O59952 (derivada de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*)). Las lipasas preferidas incluirían las comercializadas con el nombre comercial Lipex®, Lipolex® y Lipoclean®. Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US-4.435.307, US-5.648.263, US-5.691.178, US-5.776.757 y WO 89/09259.

- 40 Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US-4.435.307, US-5.648.263, US-5.691.178, US-5.776.757 y WO 89/09259.

- 50 Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen ventajas de cuidado del color. Los ejemplos de estas celulasas son las celulasas descritas en EP-0 495 257, EP-0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasas como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US-5.457.046, US-5.686.593, US-5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

Las celulasas disponibles en el mercado incluyen CELLUZYME®, y CAREZYME® (Novozymes A/S), CLAZINASE®, y PURADAX HA® (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)® (Kao Corporation).

- 55 Peroxidasas/Oxidasas: Las peroxidasas/oxidasas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Los ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de Coprinus, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

- 60 Las peroxidasas comerciales incluyen GUARDZYME® (Novozymes A/S).

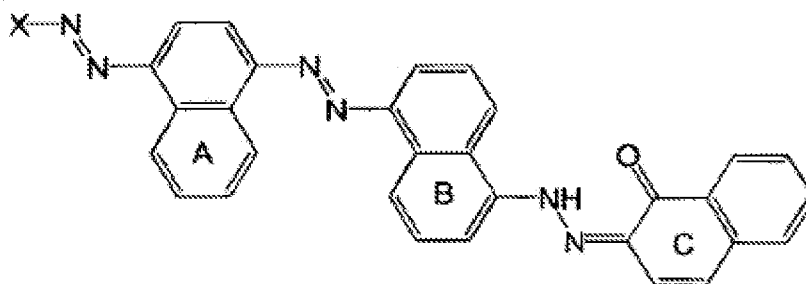
Otras enzimas: Otras enzimas preferidas incluyen las pectato liasas vendidas con los nombres comerciales Pectawash®, Pectaway® y las manasas vendidas con los nombres comerciales Mannaway® (todas de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y Purabrite® (Genencor International Inc., Palo Alto, California).

La enzima o enzimas deterativas se pueden incluir en una composición detergente añadiendo por separado los aditivos que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, granulado, un líquido, una suspensión acuosa. Las formulaciones de aditivo detergente son granulados, en especial granulados sin polvo, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones acuosas.

Los granulados sin polvo se pueden producir, por ejemplo, según se describe en US-4.106.991 y en US-4.661.452, y opcionalmente pueden estar revestidos con métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de materiales de recubrimiento cerúleos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) que tienen pesos moleculares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y que tienen de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y monoglicéridos y diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos. Los ejemplos de materiales de recubrimiento filmógenos adecuados para aplicar mediante técnicas de lecho fluidizado se proporcionan en GB-1483591. Las preparaciones de enzima líquida pueden, por ejemplo, estabilizarse por adición de un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol azucarado, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP-238.216.

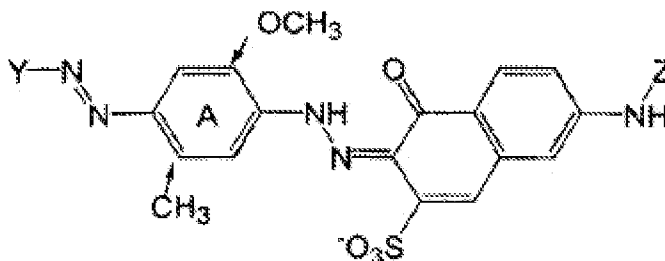
La composición puede comprender un agente de matizado de tejidos. Los agentes de matizado de tejidos adecuados incluyen tintes, conjugados de tinte-arcilla, y pigmentos que preferiblemente satisfacen las necesidades del Método de ensayo 1 descrito más adelante en la presente memoria descriptiva. Los tintes adecuados incluyen pequeñas moléculas de tinte y moléculas poliméricas. Los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de pequeñas moléculas seleccionados del grupo que consiste en tintes que se encuentran en las clasificaciones de índice de color (C.I.) de Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet y Basic Red, o mezclas de los mismos, por ejemplo:

(1) Tintes azules directos de tipo tris-azo de fórmula



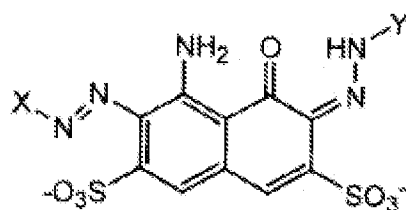
donde al menos dos de los anillos de naftilo A, B y C están sustituidos por un grupo sulfonato, el anillo C puede estar sustituido en la posición 5 por un grupo NH_2 o NHPH , X es un anillo de bencilo o naftilo sustituido con hasta 2 grupos sulfonato y puede estar sustituido en la posición 2 con un grupo OH y puede también estar sustituido con un grupo NH_2 o NHPH .

(2) Tintes directos violeta de tipo bis-azo de fórmula:



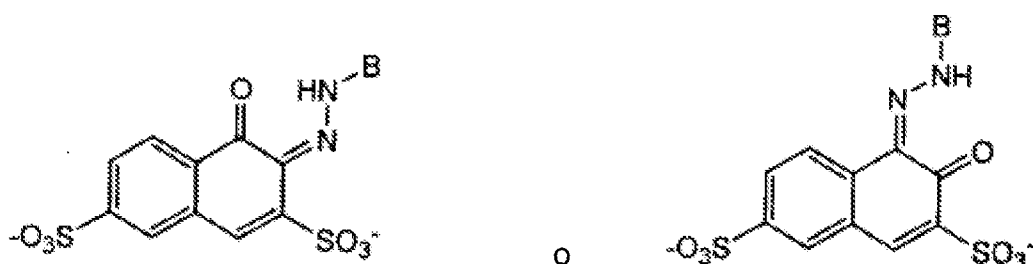
donde Z es H o fenilo, el anillo A está preferiblemente sustituido por un metilo y grupo metoxi en las posiciones indicadas mediante flechas, el anillo A puede también ser un anillo de tipo naftilo, el grupo Y es un anillo bencílico o un anillo naftílico, que está sustituido por un grupo sulfato y puede ser mono o disustituido por grupos metilo.

(3) Tintes ácidos azules o rojos de fórmula



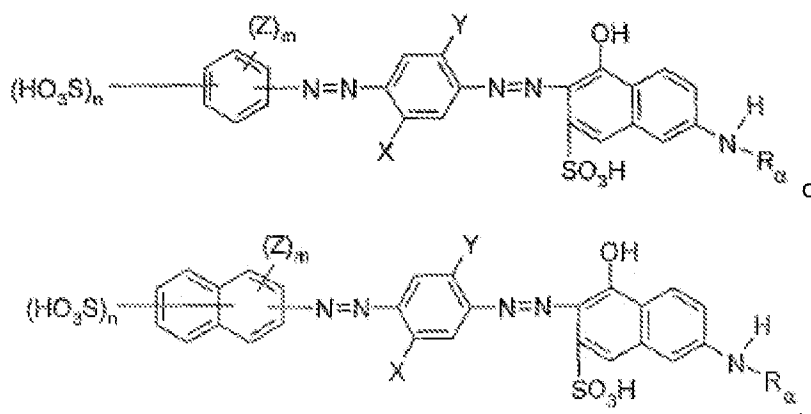
donde X e Y deben ser, al menos uno de los dos, un grupo aromático. En un aspecto, tanto los grupos aromáticos pueden ser un grupo bencilo o naftilo sustituido que puede estar sustituido con grupos no solubles en agua como, por ejemplo, grupos alquilo o alcoxi o arilo, X e Y pueden no estar sustituidos con grupos solubles en agua como, por ejemplo, sulfonatos o carboxilatos. En otro aspecto, X es un grupo bencilo sustituido con un grupo nitro e Y es un grupo bencilo

(4) Tintes ácidos rojos de la estructura



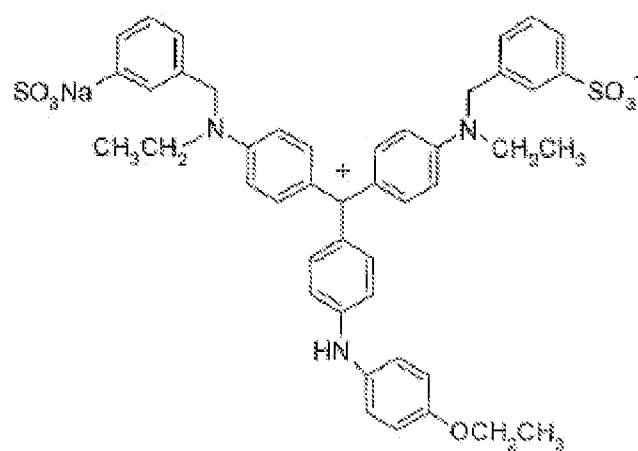
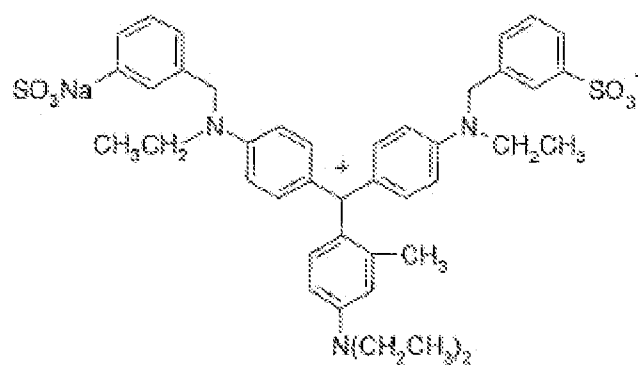
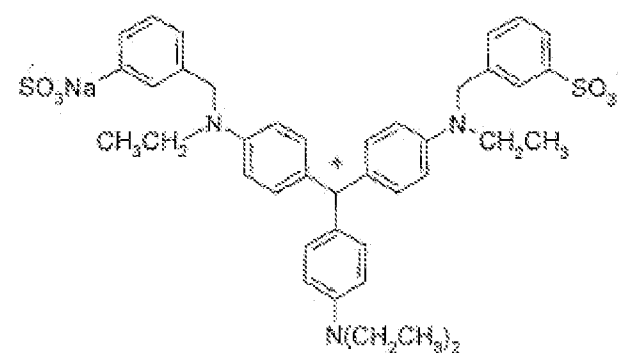
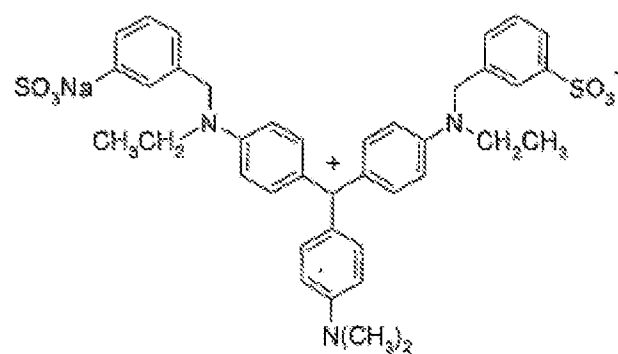
donde B es un grupo naftilo o bencilo que puede estar sustituido con grupos no solubles en agua como, por ejemplo, grupos alquilo o alquilo o arilo, B puede no estar sustituido con grupos solubles en agua como, por ejemplo, sulfonatos o carboxilatos.

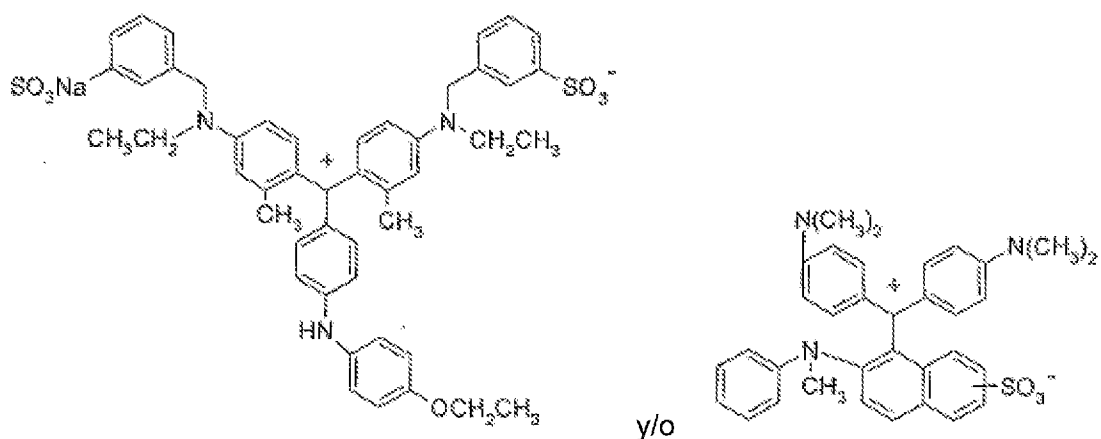
(5) Tintes de tipo dis-azo de la estructura



donde X e Y, independientemente entre sí, son cada uno hidrógeno, alquilo C₁-C₄ o alcoxi C₁-C₄, R_α es hidrógeno o arilo, Z es alquilo C₁-C₄; alcoxi C₁-C₄; halógeno; hidroxilo o carboxilo, n es 1 o 2 y m es 0, 1 o 2, así como sales correspondientes de los mismos y mezclas de los mismos

(6) Tintes de trifenilmetano de las siguientes estructuras





y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de moléculas pequeñas seleccionados del grupo que consiste en los tintes de número, según Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, Reino Unido): Direct Violet 9, Direct Violet 35, Direct Violet 48, Direct Violet 51, Direct Violet 66, Direct Violet 99, Direct Blue 1, Direct Blue 71, Direct Blue 80, Direct Blue 279, Acid Red 17, Acid Red 73, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Violet 15, Acid Violet 17, Acid Violet 24, Acid Violet 43, Acid Red 52, Acid Violet 49, Acid Blue 15, Acid Blue 17, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 40, Acid Blue 45, Acid Blue 75, Acid Blue 80, Acid Blue 83, Acid Blue 90 y Acid Blue 113, Acid Black 1, Basic Violet 1, Basic Violet 3, Basic Violet 4, Basic Violet 10, Basic Violet 35, Basic Blue 3, Basic Blue 16, Basic Blue 22, Basic Blue 47, Basic Blue 66, Basic Blue 75, Basic Blue 159 y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de moléculas pequeñas seleccionados del grupo que consiste en los números, según Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, Reino Unido) Acid Violet 17, Acid Violet 43, Acid Red 52, Acid Red 73, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 45, Acid Blue 113, Acid Black 1, Direct Blue 1, Direct Blue 71, Direct Violet 51 y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de moléculas pequeñas seleccionados del grupo que consiste en los números, según Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, Reino Unido) Acid Violet 17, Direct Blue 71, Direct Violet 51, Direct Blue 1, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Blue 29, Acid Blue 113 o mezclas de los mismos.

Los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en polímeros que contienen cromógenos conjugados (conjugados de tinte polimérico) y polímeros con cromógenos copolimerizados en la cadena principal del polímero y mezclas de los mismos.

En otro aspecto, los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en colorantes con elevada afinidad por la tela comercializados con el nombre Liquitint® (Milliken, Spartanburg, South Carolina, EE. UU.), conjugados de tinte polimérico formados a partir de, al menos, un tinte reactivo y un polímero seleccionado del grupo que consiste en un resto hidroxilo, un resto amina primaria, un resto amina secundaria, un resto tiol y mezclas de los mismos. En otro aspecto adicional, los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en Liquitint® (Milliken, Spartanburg, South Carolina, EE. UU.) Violet CT, carboximetilcelulosa (CMC) conjugada con un tinte Reactive Blue, Reactive Violet o Reactive Red como, por ejemplo, CMC conjugado con los tintes de nombre, según el código C.I. Reactive Blue 19, comercializado por Megazyme, Wicklow, Irlanda, con el nombre de producto AZO-CM-CELLULOSE, código de producto S-ACMC, colorantes poliméricos de trifenilmetano alcoxilado, colorantes poliméricos de tiofeno alcoxilado, y mezclas de los mismos.

Los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que comprende, al menos, un tinte catiónico/básico y una arcilla de tipo esmectita, y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que consiste en un tinte catiónico/básico seleccionado del grupo que consiste en C.I. Basic Yellow, del 1 al 108, C.I. Basic Orange, del 1 al 69, C.I. Basic Red, del 1 al 118, C.I. Basic Violet, del 1 al 51, C.I. Basic Blue, del 1 al 164, C.I. Basic Green, del 1 al 14, C.I. Basic Brown, del 1 al 23; C.I. Basic Black, del 1 al 11; y una arcilla seleccionada del grupo que consiste en arcilla de tipo montmorillonita, arcilla de tipo hectorita, arcilla de tipo saponita y mezclas de los mismos. En otro aspecto adicional, los conjugados de arcilla-tinte adecuados incluyen conjugados de arcilla-tinte seleccionados del grupo que consiste en: conjugado de montmorillonita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de montmorillonita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de montmorillonita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de montmorillonita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de montmorillonita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de montmorillonita C.I. Basic Black 2, conjugado de hectorita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de hectorita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de hectorita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de hectorita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de hectorita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de hectorita C.I. Basic Black 2, conjugado de saponita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de saponita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de saponita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de saponita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de saponita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de saponita C.I. Basic Black 2 conjugado y mezclas de los mismos.

Los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en flavantrona, indantrona, indantrona clorada que contiene de 1 a 4 átomos de cloro, pirantrona, dicloropirantrona, monobromodicloropirantrona, dibromodicloropirantrona, tetrabromopirantrona, diimida del ácido perilen-3,4,9,10-tetracarboxílico, en donde los grupos imida pueden ser no sustituidos o sustituidos por alquilo C1-C3 o un radical fenilo o heterocíclico, y en donde los radicales fenilo y heterocíclicos pueden, de forma adicional, llevar sustituyentes que no confieran solubilidad en agua, amidas del ácido antrapirimidincarboxílico, violantrona, isoviolantrona, pigmentos de tipo dioxazina, ftalocianina de cobre, que puede contener hasta 2 átomos de cloro por molécula, ftalocianina de policloro-cobre o ftalocianina de polibromocloro-cobre que contiene hasta 14 átomos de bromo por molécula y mezclas de los mismos.

En otro aspecto, los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en Ultramarine Blue (nombre C.I. Pigment Blue 29), Ultramarine Violet (C.I. Pigment Violet 15) y mezclas de los mismos.

Los agentes de matizado de tejidos anteriormente mencionados pueden usarse en combinación (puede usarse cualquier mezcla de agentes de matizado de tejidos). Pueden adquirirse agentes de matizado de tejidos adecuados de Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.; Ciba Specialty Chemicals, Basel, Suiza; BASF, Ludwigshafen, Alemania; Dayglo Color Corporation, Mumbai, India; Organic Dyestuffs Corp., East Providence, Rhode Island, EE. UU.; Dystar, Frankfurt, Alemania; Lanxess, Leverkusen, Alemania; Megazyme, Wicklow, Irlanda; Clariant, Muttentz, Suiza; Avecia, Manchester, Reino Unido y/o según los ejemplos contenidos en la presente memoria. En US-7.208.459 B2 se describen agentes de matizado adecuados.

Método de ensayo 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La composición de limpieza puede comprender además aditivos reforzantes de la detergencia, tales como aditivos reforzantes de la detergencia de tipo carbonato, bicarbonato o silicatos, que pueden ser zeolitas tales como Zeolita A, Zeolita MAP (máximo aluminio de tipo P). Las zeolitas que pueden utilizarse para el lavado de ropa tienen preferiblemente la fórmula $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$ y el tamaño de partículas es usualmente entre 1-10 μm para la zeolita A y 0,7-2 μm para la zeolita MAP. Otros aditivos son el metasilicato sódico ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) fuertemente alcalino y preferiblemente utilizado en el lavado de vajilla. En realizaciones preferidas, la cantidad de aditivo reforzante de la detergencia puede ser superior a 5 %, superior a 10 %, superior a 20 %, superior a 30 %, superior a 40 % o superior a 50 %, y puede ser inferior a 80 %, 65 %. En un detergente para lavado de vajillas, el nivel de aditivo reforzante de la detergencia es de forma típica 40-65 %, especialmente 50-65 % o incluso 75-90 %.

La composición puede comprender un encapsulado. En un aspecto, un encapsulado comprende un núcleo, una envoltura que tiene una superficie interior y una superficie exterior, encapsulando dicha envoltura dicho núcleo.

5 En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en perfumes; abrillantadores; tintes; repelentes de insectos; siliconas; ceras; agentes saborizantes; vitaminas; agentes suavizantes de telas; agentes para el cuidado de la piel, en un aspecto, parafinas; enzimas; agentes antibacterianos; blanqueadores; estimulantes sensoriales; y mezclas de los mismos; y dicha envoltura puede comprender un material
10 seleccionado del grupo que consiste en polietilenos; poliamidas; poliestirenos; poliisoprenos; policarbonatos; poliésteres; poliacrilatos; aminoplastos, en un aspecto, dicho aminoplasto puede comprender poliureas, poliuretano, y/o poliureauretano, en un aspecto, dicha poliurea puede comprender polioximetilenurea y/o melamina formaldehído; poliolefinas; polisacáridos, en un aspecto dicho polisacárido puede comprender alginato y/o quitosana; gelatina; goma laca; resinas epoxi; polímeros de vinilo; compuestos inorgánicos insolubles en agua; silicona; y mezclas de los mismos.

15 En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender perfume.

En un aspecto de dicho encapsulado, dicha envoltura puede comprender melamina formaldehído y/o melamina formaldehído reticulada.

20 En un aspecto, los encapsulados adecuados pueden comprender un material de núcleo y una envoltura, rodeando dicha envoltura al menos parcialmente dicho material de núcleo, que se describe. Al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener una resistencia a la fractura de aproximadamente 0,2 MPa a aproximadamente 10 MPa, de aproximadamente 0,4 MPa a aproximadamente 5 MPa, de aproximadamente 0,6 MPa a aproximadamente 3,5 MPa, o incluso de aproximadamente 0,7 MPa a aproximadamente 3 MPa; y un escape de agente beneficioso de 0 % a aproximadamente 30 %, de 0 % a aproximadamente 20 %, o incluso de 0 % a aproximadamente 5 %.

25 En un aspecto, al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener un tamaño de partículas de aproximadamente 1 micrómetros a aproximadamente 80 micrómetros, de aproximadamente 5 micrómetros a 60 micrómetros, de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 50 micrómetros, o incluso de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 40 micrómetros.

30 En un aspecto, al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener un espesor de pared de la partícula de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 180 nm, o incluso de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 160 nm.

35 En un aspecto, dicho material de núcleo de los encapsulados puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en una materia prima de perfume y/u opcionalmente un material seleccionado del grupo que consiste en aceite vegetal, que incluye aceites vegetales puros y/o mezclados incluidos aceite de ricino, aceite de coco, aceite de algodón, aceite de orujo de uva, colza, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de lino, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de coco, aceite de almendra de palma, aceite de ricino, aceite de limón y mezclas de los mismos; ésteres de aceites vegetales, ésteres, incluidos adipato de dibutilo, ftalato de dibutilo, benciladipato de butilo, octiladipato de bencilo, fosfato de tricresilo, fosfato de trioctilo y mezclas de los mismos; hidrocarburos de cadena lineal o ramificada, incluidos aquellos hidrocarburos de cadena lineal o ramificada que tienen un punto de ebullición superior a aproximadamente 80 °C; terfenilos parcialmente hidrogenados, ftalatos de dialquilo, alquilbifenilo, incluido monoisopropilbifenilo, naftaleno alquilado, incluido dipropilnaftaleno, sustancias volátiles procedentes del petróleo incluidos queroseno, aceite mineral y mezclas de los mismos; disolventes aromáticos, incluidos benceno, tolueno y mezclas de los mismos; aceites de silicona; y mezclas de los mismos.

40 En un aspecto, dicho material de la pared de los encapsulados puede comprender una resina que incluye el producto de reacción de un aldehído y una amina, los aldehídos adecuados incluyen formaldehído. Las aminas adecuadas incluyen melamina, urea, benzoguanamina, glicolurilo, y mezclas de los mismos. Las melaminas adecuadas incluyen metilol melamina, metilol melamina metilada, iminomelamina y mezclas de los mismos. Las ureas adecuadas incluyen dimetilol urea, dimetilol urea metilada, urea-resorcinol, y mezclas de los mismos.

45 En un aspecto, los eliminadores de formaldehído adecuados se pueden emplear con los encapsulados, por ejemplo, en una suspensión acuosa de cápsulas y/o se añaden al producto de consumo antes, durante o después de añadir los encapsulados a dicho producto de consumo.

50 Las cápsulas adecuadas se pueden preparar siguiendo las enseñanzas de USPA 2008/0305982 A1; y/o de USPA 2009/0247449 A1. Alternativamente, las cápsulas adecuadas se pueden adquirir de Appleton Papers Inc. de Appleton, Wisconsin EE. UU.

55 Además, los materiales para fabricar los encapsulados anteriormente mencionados se pueden obtener de Solutia Inc. (St Louis, Missouri EE. UU.), Cytec Industries (West Paterson, New Jersey EE. UU.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri EE. UU.), CP Kelco Corp. de San Diego, California, EE. UU.; BASF AG de Ludwigshafen, Alemania; Rhodia Corp. de Cranbury, Nueva Jersey, EE. UU.; Hercules Corp. de Wilmington, Delaware, EE. UU.; Agrium Inc. de Calgary, Alberta,

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

En un aspecto, la composición puede comprender un estabilizador de enzima seleccionado del grupo que consiste en (a) sales inorgánicas seleccionadas del grupo que consiste en sales de calcio, sales de magnesio y mezclas de las mismas; (b) carbohidratos seleccionados del grupo que consiste en oligosacáridos, polisacáridos y mezclas de los mismos; (c) inhibidores de la proteasa reversibles eficaces para masa seleccionados del grupo que consiste en ácido fenilborónico y derivados de los mismos; y (d) mezclas de los mismos.

En otra realización, la composición comprende: (1) inhibidores de la proteasa reversibles tales como un compuesto que contiene boro; (2) 1-2 propano diol; (3) formiato cálcico y/o formiato sódico; y (4) cualquier combinación de los mismos.

En un aspecto, la composición puede comprender un estructurante seleccionado del grupo que consiste en diglicéridos y triglicéridos, celulosa microcristalina con diestearato de etilenglicol, materiales de tipo celulósico, microfibra de celulosa, biopolímeros, goma xantano, goma gellan y mezclas de los mismos.

El detergente puede comprender uno o más polímeros. Los ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinil-pirrolidona), poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliácridatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico.

El detergente puede incluir un sistema blanqueador, que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que puede combinarse con un activador del blanqueador formador de perácido tal como una tetraacetiletilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueador puede comprender peroxiacidos de tipo, por ejemplo, la amida, imida, o sulfona.

En general, cuando se utiliza un agente blanqueante, las composiciones de la presente invención pueden comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 %, de agente blanqueante en peso de la composición de la invención limpiadora.

Las variantes de la enzima de la invención se pueden estabilizar usando agentes estabilizantes convencionales, y/o inhibidores de la proteasa p. ej., un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol azucarado, sales tales como cloruro sódico y cloruro potásico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, p. ej., un éster de borato aromático, o un derivado del ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, o un aldehído péptido tal como aldehídos di-, tri- o tetrapéptidos o análogos de aldehído (bien en la forma de B1-B0-R en donde, R es H, CH₃, CX₃, CHX₂, o CH₂X (X=halógeno), B0 es un resto de aminoácido simple (preferiblemente con una cadena lateral alifática o aromática opcionalmente sustituida); y B1 consiste en uno o más restos de aminoácidos (preferiblemente uno, dos o tres) que comprende opcionalmente un grupo protector del extremo N, o como se describe en WO09118375, WO98/13459) o un inhibidor de proteasa de tipo proteico tal como RASI, BASI, WASI (inhibidores bifuncionales de alfa-amilasa/subtilisina de arroz, cebada y trigo) o CI2 o SSI. La composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO 92/19709 y WO 92/19708 o US-6472364. En algunas realizaciones, las enzimas empleadas en la presente invención se estabilizan por la presencia de fuentes solubles en agua de zinc (II), calcio (II) y/o iones (II) magnesio en las composiciones terminadas que proporcionan dichos iones a las enzimas, así como además otros iones de metal (p. ej., bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II), y oxovanadio(IV)).

La composición puede incluir además otros ingredientes detergentes convencionales tales como, por ejemplo, acondicionadores de telas incluidos arcillas, reforzadores de espuma, supresores de jabonaduras, agentes anticorrosión, agentes suspensores de la suciedad, agentes antirredeposición de la suciedad, tintes, bactericidas, abrillantadores ópticos, hidrótrofos, inhibidores del deslustre, disolventes orgánicos tales como etanol o perfumes. Además, el detergente podría incluir un pretratante o un reforzador, que se añade al lavado para aumentar el nivel general de limpieza; algunos de estos aditivos también se pueden utilizar como un agente de pretratamiento aplicado al material textil antes de la etapa de lavado.

Se contempla en este momento que se puede añadir a las composiciones detergentes cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, en una cantidad correspondiente a 0,001-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0,005-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, más preferiblemente 0,01-1 mg de proteína enzimática por solución de lavado y en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado. Sin embargo, las composiciones de la presente invención comprenden al menos 0,0001 a aproximadamente 0,1 % en peso de proteína enzimática pura, tal como de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 0,01 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,01 % o de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,01 %. Sin embargo, cuando se utiliza una enzima formulada, la composición detergente comprende de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 20 % en peso, tal como de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 15 % en peso, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20 %, o de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 5 %, o de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 %.

Las variantes de alfa-amilasa útiles en la presente invención pueden incorporarse adicionalmente a las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202, que se incorpora a la presente como referencia.

La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, un comprimido, un polvo, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido. La composición puede ser un agente limpiador universal “de limpieza intensiva”, una forma de pasta universal, un tipo líquido de limpieza intensiva, un líquido para telas delicados, un agente para el lavado manual de vajillas, un agente para lavado de vajillas de acción suave, un tipo muy espumante, un agente para lavavajillas automático, diferentes pastillas, un granulado para lavado de vajillas, un líquido para lavado de vajillas, y un coadyuvante de aclarado. La composición puede incluir también envases en dosis unitaria, incluidos los conocidos en la técnica y los que son solubles en agua, insolubles en agua y/o permeables en agua. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo de forma típica un máximo de 70 % de agua y 0-30 % de disolvente orgánico, o bien no acuoso o bien una solución que contenía más de 0,5 g/l de la composición detergente.

La composición de la invención se puede formular, por ejemplo, como una composición detergente para lavado de ropa a mano o a máquina, incluida una composición aditiva para lavado de ropa adecuada para el pretratamiento de telas manchadas y una composición suavizante de telas añadida durante el aclarado, o bien formulada como una composición detergente para usar en operaciones de limpieza doméstica general de superficies duras, o bien se puede formular para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina. El detergente puede ser una forma pulverulenta o granulada, o puede estar en la forma de un líquido, gel o pasta o bien en forma de un producto en dosis unitaria tal como una pastilla o una bolsa, incluidas las bolsas multicompartimentales, o bien el detergente puede estar en la forma de una lámina.

Ejemplo de composición detergente para lavado de ropa

Las siguientes son composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa especialmente adecuadas para lavadoras de carga superior (1 y 2) y lavadoras de carga frontal (3), respectivamente.

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

	Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4
	NaOH	2,44	1,8	
5	Sulfonato de cumeno sódico			1
	Formiato sódico		0,11	
	Amilasas de esta invención (25 mg/g de sustancia activa)	0,4	0,7	0,5
10	Agua, componentes estéticos (Tintes, perfumes) y componentes minoritarios (enzimas, disolventes, estructurantes)	Resto	Resto	Resto
15	¹ El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno. ² Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH. ³ El polímero de limpieza de grasa anfífilo alcoxlado es una polietilenimina (PM = 600) con 24 grupos etoxilato por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH			

Ejemplos de detergentes para lavavajillas

Los siguientes ejemplos 4– 8 de detergentes para lavavajillas son en forma de geles.

		4 (% en peso)	5 (% en peso)	6 (% en peso)	7 (% en peso)	8 (% en peso)
25	Agente humectante ¹	1,0	1,3	0,8	1	0,9
	Benzoato sódico (33 % de sustancia activa)	0,61	0,61	0,61	0,6	0,6
	Goma de xantano	1,0	0,8	1,2	1	1,1
	Sulfato de sodio	10,0	10,0	10,0	8	10
30	Perfume	0,03	0,05	0,03	0,06	0,1
	Silicato de sodio	0	0	0	0	2
	Ácido cítrico (50 % de sustancia activa)	12,5	0	11	0	12
	GLDA	0	7	0	8	0
35	Savinase Ultra XL (44 mg de sustancia activa/g) ²	0,7	0	0,3	0	0
	Ácido 4-formilfenilborónico	0	0	0,05	0	0
	Proteasa encapsulada (10 mg/g) ³	0,0	2,0	0,0	0	0
	FN3 líquido (48 mg de sustancia activa/g) ⁴	0,0	0,0	0	0,6	0
40	Pellets de Proteasa (123 mg de sustancia activa/g) ⁴	0	0	0	0	0,5
	Etanol	0,0	0,0	0	0,3	0
	Hidróxido de potasio (45 % activo)	14,6	14,6	14,6	14	0
	Cloruro cálcico (25 % de sustancia activa)	1,8	1,8	1,8	1,1	0,4
45	Colorante	0,05	0,05	0,05	0,05	0,02
	Proxcel GXL™ (19 % de sustancia activa) ⁸	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	Acusol™ 820 ⁹	0,34	0,34	0,3	0,35	0,3
	Acusol™ 425N (50 % de sustancia activa) ⁹	3,0	3,0	3,5	2,5	2
50	Amilasas de esta invención (25 mg/g de sustancia activa) ²	0,2	0,5	0,4	0,3	0,1
	Agua y otros ingredientes adyuvantes:	Resto hasta 100 %	Resto hasta 100 %	Resto hasta 100 %	Resto hasta 100 %	Resto hasta 100 %
55	¹ Comercializado con el nombre comercial Polytergent® SLF-18 por BASF, Ludwigshafen, Alemania. ² Comercializado por Novozymes, Dinamarca. ³ Proteasa encapsulada de esta invención ⁴ Comercializado por Genencor International, California, EE.UU. Los pellets de proteasa adecuados son comercializados con los nombres comerciales FN3® y Properase®. ⁶ Comercializado por Alco Chemical, Tennessee, EE.UU. ⁷ Un polímero adecuado de este tipo es comercializado con el nombre comercial Aqualic TL de Nippon Shokubai, Japón. ⁸ Comercializado por Arch Chemicals Incorporated, Smyrna, Georgia, EE.UU. ⁹ Comercializado por Rohm and Haas, Philadelphia, Pennsylvania, EE.UU. 2.0R Silicate es suministrado por PQ Corporation, Malvern, PA, EE.UU. El carbonato sódico es comercializado por Solvay, Houston, Texas, EE. UU. Percarbonato sódico (2Na ₂ CO ₃ ·3H ₂ O ₂) suministrado por Solvay, Houston, Texas, EE.UU.					
60						
65						

El hidroxietano-difosfonato (HEDP) es suministrado por Dow Chemical, Midland, Michigan, EE.UU.

Composiciones detergentes para vajillas

La enzima de la invención también puede utilizarse en composiciones detergentes para lavado de vajillas, incluidas las siguientes:

1) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

Tensioactivo no iónico	0,4 - 2,5 %
Metasilicato sódico	0 - 20 %
Disilicato de sodio	3 - 20 %
Trifosfato sódico	0 - 40 %
Carbonato sódico	0 - 20 %
Perborato sódico	2 - 9 %
Tetraacetiletilendiamina (ED)	1 - 4 %
Sulfato sódico	5 - 33 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %

2) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

Tensioactivo no iónico (p. ej., etoxilato de alcohol)	1 - 2 %
Disilicato de sodio	2 - 30 %
Carbonato sódico	10- 50 %
Fosfonato sódico	0- 5 %
Citrato trisódico deshidratado	9- 30 %
Acetato de nitrilotrisodium (NTA)	0- 20 %
Monohidrato de perborato sódico	5- 10 %
Tetraacetiletilendiamina (ED)	1- 2 %
Polímero de poliacrilato (por ejemplo, copolímero de ácido maleico/ácido acrílico)	6- 25 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Perfume	0,1 - 0,5 %
Agua	5- 10

3) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

Tensioactivo no iónico	0,5 - 2,0 %
Disilicato de sodio	25- 40 %
Citrato sódico	30- 55 %
Carbonato sódico	0- 29 %
Bicarbonato sódico	0- 20 %
Monohidrato de perborato sódico	0- 15 %
Tetraacetiletilendiamina (TAED)	0- 6 %
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	0- 5 %
Arcilla	1- 3 %
Ácidos de poliamina	0- 20 %
Poliacrilato de sodio	0- 8 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %

4) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

Tensioactivo no iónico	1- 2 %
Zeolita MAP	0- 42 %
Disilicato de sodio	0- 34 %
Citrato sódico	0- 12 %
Carbonato sódico	0- 20 %
Monohidrato de perborato sódico	7- 15 %

Tetraacetiletilendiamina (TAED)	0- 3 %
Polímero	0- 4 %
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	0- 5 %
Fosfonato orgánico	0- 4 %
Arcilla	1- 2 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Sulfato sódico	Resto

5) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

Tensioactivo no iónico	1 - 7 %
Disilicato de sodio	18 - 30 %
Citrato trisódico	10 - 24 %
Carbonato sódico	12 - 20 %
Monopersulfato (2 KHSO ₅ .KHSO ₄ .K ₂ SO ₄)	15 - 21 %
Estabilizante del blanqueador	0,1- 2 %
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	0 - 6 %
Pentaacetato de dietilentriamina, sal pentasódica	0 - 2,5 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Sulfato sódico, agua	Resto

6) Composición de lavado de vajillas en polvo y líquida con sistema tensioactivo de limpieza

Tensioactivo no iónico	0 - 1,5 %
N-óxido de octadecil dimetilamina dihidrato	0 - 5 %
Mezcla 80:20 en peso C 18/C16 en peso de N-óxido de octadecil dimetilamina dihidrato y N-óxido de hexadecil dimetilamina	0 - 4 %
Mezcla 70:30 C 18/C16 en peso de N-óxido de octadecil bis(hidroxietil)amina anhidro y N-óxido de hexadecil bis(hidroxietil)amina anhidro	0 - 5 %
Alquil etoxisulfato C ₁₃ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 3	0 - 10 %
Alquil etoxisulfato C ₁₂ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 3	0 - 5 %
Alcohol etoxilado C ₁₃ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 12	0 - 5 %
Una mezcla de alcoholes etoxilados C ₁₂ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 9	0 - 6,5 %
Una mezcla de alcoholes etoxilados C ₁₃ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 30	0 - 4 %
Disilicato de sodio	0 - 33 %
Tripolifosfato de sodio	0 - 46 %
Citrato sódico	0 - 28 %
Ácido cítrico	0 - 29 %
Carbonato sódico	0 - 20 %
Monohidrato de perborato sódico	0 - 11,5 %
Tetraacetiletilendiamina (TAED)	0 - 4 %
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	0 - 7,5 %
Sulfato sódico	0 - 12,5 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %

7) Composición líquida para lavado de vajillas automático no acuosa

Tensioactivo no iónico líquido (p. ej., etoxilados de alcohol)	2,0- 10,0 %
Silicato de metal alcalino	3,0- 15,0 %
Fosfato de metal alcalino	0- 40,0 %
Vehículo líquido seleccionado de glicoles, poliglicoles, polióxidos, glicoléteres superiores	25,0- 45,0 %
Estabilizante (por ejemplo, un éster parcial de ácido fosfórico y un alcohol C ₁₆ -C ₁₈)	0,5- 7,0 %
Supresor de la espuma (p. ej., silicona)	0 - 1,5 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %

8) Composición líquida de lavado de vajillas no acuosa

	Tensioactivo no iónico líquido (p. ej., etoxilados de alcohol)	2,0- 10,0 %
	Silicato de sodio	3,0- 15,0 %
	Carbonato de metal alcalino	7,0- 20,0 %
5	Citrato sódico	0,0- 1,5 %
	Sistema estabilizante (p. ej., mezclas de silicona finamente dividida y dialquil poliglicol éteres de bajo peso molecular)	0,5- 7,0 %
	Polímero de poliacrilato de bajo peso molecular	5,0 - 15,0 %
10	Espesante de gel de arcilla (p. ej., bentonita)	0,0- 10,0 %
	Polímero de hidroxipropilcelulosa	0,0- 0,6 %
	Enzimas	0,0001 - 0,1 %
	Vehículo líquido seleccionado de glicoles, poliglicoles, polióxidos, y glicoléteres superiores	Resto

9) Composición líquida tixotrópica para lavado de vajillas automático

	Ácido graso C ₁₂ -C ₁₄	0 - 0,5 %
	Tensionactivo de copolímero en bloques	1,5- 15,0 %
20	Citrato sódico	0 - 12 %
	Tripolifosfato de sodio	0 - 15 %
	Carbonato sódico	0 - 8 %
	Triestearato de aluminio	0 - 0,1 %
25	Cumenosulfonato de sodio	0 - 1,7 %
	Espesante de poliacrilato	1,32 - 2,5 %
	Poliacrilato de sodio	2,4- 6,0 %
	Ácido bórico	0 - 4,0 %
30	Formiato sódico	0 - 0,45 %
	Formato de calcio	0 - 0,2 %
	N-decidifenilóxido disulfonato sódico	0 - 4,0 %
	Monoetanolamina (MEA)	0 - 1,86 %
35	Hidróxido sódico (50 %)	1,9- 9,3 %
	1,2-propanodiol	0 - 9,4 %
	Enzimas	0,0001 - 0,1 %
	Supresor de las jabonaduras, tinte, perfumes, agua	Resto

10) Composición líquida para lavado de vajillas automático

	Alcohol etoxilado	0 - 20 %
	Sulfonato de éster de ácido graso;	0 - 30 %
45	Sulfato de dodecilo sódico	0 - 20 %
	Alquilpoliglucósido	0 - 21 %
	Ácido oléico	0 - 10 %
	Disilicato sódico monohidratado	0 - 33 %
50	Citrato sódico dihidratado	0 - 33 %
	Estearato sódico	0 - 2,5 %
	Monohidrato de perborato sódico	0 - 13 %
	Tetraacetiletilendiamina (TAED)	0 - 8 %
55	Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	4 - 8 %
	Enzimas	0,0001 - 0,1 %

11) Composición líquida para lavado de vajillas automático que contiene partículas de blanqueador protegidas

60	Silicato de sodio	5 - 10 %
	Pirofosfato tetrapotásico	0 - 25 %
	Trifosfato sódico	0 - 2 %
	Carbonato potásico	4 - 8 %
65	Partículas de blanqueador protegido, por ejemplo, cloro	5 - 10 %
	Espesante polimérico	0,7- 1,5 %

Hidróxido de potasio	0 - 2 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Agua	Resto

12) Composiciones para lavado de vajillas automático como se describe en 1), 2), 3), 4), 6) y 10), en donde el perborato 5 se sustituye por percarbonato.

13) Composiciones para lavado de vajillas automático como se describe en 1) - 6) que de forma adicional contienen un catalizador de manganeso. El catalizador de manganeso puede, por ejemplo, ser uno de los compuestos descritos en "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature, 369, 1994, pp. 637-639.

La presente invención está también dirigida a métodos de uso de composiciones que comprenden las variantes de alfa-amilasa para la limpieza.

La variante alfa-amilasa se incorpora preferiblemente en y/o se utiliza junto con composiciones detergentes, por ejemplo en composiciones detergentes para lavandería, por ejemplo composiciones detergentes para lavado doméstico de ropa, especialmente composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa. Especialmente, la composición detergente comprende al menos un agente quelante y la composición detergente comprende normalmente adyuvantes/ingredientes detergentes convencionales tales como tensioactivos (aniónicos, catiónicos, no iónicos, de ion híbrido, anfóteros), aditivos reforzantes de la detergencia, blanqueadores, polímeros, otras enzimas y otros ingredientes, por ejemplo, como se describe en los documentos WO2007/130562 y WO2007/149806. Por tanto, en un aspecto útil de la presente invención, se proporciona un método de limpieza que comprende añadir a un proceso de limpieza una composición según la invención. En realizaciones preferidas, dicho proceso de limpieza se selecciona del grupo que consiste en al menos una etapa de limpieza en un proceso de limpieza de lavado de ropa, lavado de vajillas, industrial o institucional.

Debido a su actividad en valores de pH alcalinos, las α -amilasas de la invención son muy adecuadas para su uso en diversos procesos industriales, en particular, la enzima encuentra posibles aplicaciones como componente en composiciones detergentes para lavado, lavado de vajillas y limpieza de superficies duras, pero también puede ser útil en la producción de edulcorantes y etanol a partir de almidón. Las condiciones para los procesos convencionales de conversión de almidón y procesos de licuefacción y/o sacarificación se describen, por ejemplo, en las publicaciones de patente US-3.912.590 y en las publicaciones de patente EP 252.730 y 63.909.

Materiales y métodos

Enzimas:

SP722: Id. de sec. n.º: 6, comercializada por Novozymes, y descrita en el documento WO 95/26397.

SP707 o n.º 707: Id. de sec. n.º 8 (comparativa)

AA560: Id. de sec. n.º 10 (comparativa)

Métodos generales de biología molecular:

Salvo que se indique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones de ADN se llevan a cabo utilizando métodos estándar de biología molecular (Sambrook y col. (1989); Ausubel y col. (1995); Harwood and Cutting (1990).

Fermentación de alfa-amilasas y variantes

La fermentación puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos en la técnica o del siguiente modo.

Una cepa de *B. subtilis* que contiene el plásmido de expresión relevante se siembra sobre una placa de medio CL con un antibiótico relevante, y se cultiva durante la noche a 37 °C. Las colonias se transfieren a 100 ml de medio BPX suplementado con un antibiótico relevante (por ejemplo, cloranfenicol a 10 mg/l) en un matraz de agitación de 500 ml.

Composición del medio BPX:

Almidón de patata	100 g/l
Harina de cebada	50 g/l
BAN 5000 SKB	0,1 g/l
Caseinato de sodio	10 g/l
Harina de semilla de soja	20 g/l
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	9 g/l
Agente antiespumante	0,1 g/l

El cultivo se agita a 37 °C a 270 rpm durante 4 a 5 días.

Las células y residuos celulares se retiran del caldo de fermentación por centrifugación a 4.500 rpm en 20-25 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se filtra para obtener una solución completamente transparente. El filtrado se concentra y se lava sobre un filtro de UF (una membrana de corte 10.000) y el tampón se cambia a acetato 20 mM a pH 5,5, por ejemplo, mediante diálisis o filtración en gel. El filtrado de UF se aplica en una S-sepharose F.F. (General Electric, Intercambio de cationes, Matriz: agarosa reticulada, grupo funcional: $-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$) y la elución se lleva a cabo mediante elución por etapas con NaCl 0,2 M en el mismo tampón. El eluato se dializa frente a Tris 10 mM (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol), pH 9,0 y se aplica en una Q-sepharose F.F. (General Electric, intercambio aniónico, matriz: agarosa reticulada, grupo funcional: $-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) y se eluye con un gradiente lineal de NaCl 0-0,3M con 6 volúmenes de columna. Se recogen las fracciones, que contienen la actividad (medida mediante el ensayo EnzCheck), se ajusta el pH a pH 7,5 y se elimina el color restante mediante un tratamiento con carbón activo al 0,5 % p/vol. en 5 minutos. Puede además ser ventajoso añadir otra etapa de cambio de tampón, p. ej., mediante diálisis o filtración en gel a un sistema de tampón que no afecta al resultado del lavado en sí mismo, p. ej., a un tampón EPPS, un tampón glicina, un tampón acetato o similares, preferiblemente con una pequeña concentración de calcio (p. ej., 0,1 mM) para estabilizar la amilasa durante el almacenamiento y aproximadamente un 0,01 % de Triton X-100 para reducir el riesgo de adsorción de proteína enzimática a recipientes y pipetas.

Detergente modelo

Composición de detergente modelo A:

Compuesto	Cantidad g/100 g	Ingrediente activo %
	Surfactantes	
Na-LAS (92 %) (Nacconol 90G) (aniónico) (alquilbencenosulfonato lineal)	10,87	10
STEOL CS-370E (70 %) (aniónico), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m-$ (OCH_2CH_2) ₃ -OSO ₃ ⁻ , donde m=11-13	7,14	5
Bio-soft N25-7 (99,5 %) (no iónico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m-$ (OCH_2CH_2) ₇ -OH, donde y m=11-14	5	5
Ácido oleico (ácido graso)	2	2
	Disolventes	
H ₂ O	62	65
Etanol	0,5	0,5
STS [p-tolueno sulfonato sódico (40 %)]	3,75	1,5
Monopropilenglicol	2	2
	Aditivo reforzante de la detergencia	
Citrato trisódico	4	4
Trietanolamina (TEA)	0,5	0,5
	Estabilizante	
Ácido bórico	1,5	1,5
	Componentes minoritarios	
NaOH 10 N (para ajuste a pH 8,5)	0,8	0,8

Composición de detergente modelo B:

Compuesto	Cantidad g/100 g	Ingrediente activo %
	Surfactantes	
Na-LAS (92 %) (Nacconol 90G) (aniónico)	10,87	10
STEOL CS-370E (70 %) (aniónico)	7,14	5
Bio-soft N25-7 (99,5 %) (no iónico)	5	5
Ácido oleico (ácido graso)	2	2
	Disolventes	
H ₂ O	62	65
Etanol	0,5	0,5
STS [p-tolueno sulfonato sódico (40 %)]	3,75	1,5

	Monopropilenglicol	2	2
		Aditivo reforzante de la detergencia	
	Ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA)	1,5	1,5
5	Trietanolamina (TEA)	0,5	0,5
		Estabilizante	
	Ácido bórico	1,5	1,5
		Componentes minoritarios	
10	NaOH 10 N (para ajuste a pH 8,0)	0,8	0,8

Ensayo de medición de iones calcio libres

El siguiente ensayo puede utilizarse para la medición de iones calcio libres en solución y por tanto para la determinación de la capacidad de los agentes quelantes (quelantes) para reducir la concentración de iones calcio libres (Ca^{2+}) de, p. ej., 2,0 mM a 0,10 mM a pH 8.

Principio de ensayo:

Se añaden diversas cantidades de quelantes a una solución de Ca^{+2} 2,0 mM y la concentración de Ca^{+2} libres se determina utilizando un electrodo selectivo de iones calcio a pH y temperatura fijos. La concentración de quelante necesaria para reducir la concentración de calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM puede determinarse a partir de una representación de la concentración de calcio libre medida frente a la concentración de quelante. En el presente ensayo, la concentración de quelante necesaria para reducir la concentración de calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM se mide a pH 8, a 21 °C, en cloruro potásico y EPPS 49 mM.

Soluciones:

Solución de electrolito: Cloruro de potasio 4 M en agua ultrapura (agua Milli-Q).

Tampón pH 8: EPPS 50 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico) ajustado a pH 8,0 utilizando cantidades mínimas de hidróxido sódico 1 N.

Solución madre de calcio: 25 mM Ca^{2+} en tampón de pH 8, preparado a partir de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Solución madre de quelante: Quelante 15 mM (con respecto a quelante seco al 100 %) en tampón de pH 8, reajustado a pH 8,0 utilizando cantidades mínimas de NaOH 1 M o HCl 1 M.

Se utiliza agua ultra pura (agua Milli Q) para la preparación de todos los tampones y soluciones.

Equipo:

Electrodo selectivo de iones calcio de Thermo Scientific (n.º cat. 9720BNWP) calibrado frente a una solución patrón de cloruro cálcico. El electrodo se calibra según describen las directrices correspondientes al electrodo.

Procedimiento:

Se prepara una serie de viales, conteniendo cada uno 4 ml de solución madre de calcio (concentración final 2,0 mM), 1 ml de solución electrolítica (concentración final 80 mM de cloruro de potasio), solución madre de quelante en diversas cantidades (0 - 45 ml) y utilizando el tampón de pH 8 para ajustar el volumen total a 50 ml. La concentración final de EPPS en el ensayo es de 49 mM.

Después del mezclado, la concentración de Ca^{2+} libre se mide con el electrodo de calcio. La concentración de calcio libre debería determinarse en una cantidad suficiente de concentraciones de quelante diferentes para cada quelante ensayado, asegurándose de que el conjunto de datos cubra todo el intervalo de 2,0 mM de iones calcio libres a un valor inferior a 0,10 mM o que la concentración final de quelante en el ensayo sea superior a 10,0 mM. Un número adecuado de puntos de datos es 8 o más. La concentración de quelante requerida para reducir los iones calcio libres de 2,0 mM iniciales a 0,10 mM se obtiene de una representación gráfica de la concentración de iones calcio libres medida frente a la concentración de quelante por interpolación.

Las soluciones se equilibran hasta la temperatura deseada, que en el presente ensayo es de 21 °C.

Determinación de log K

Los agentes quelantes también pueden caracterizarse por la constante de unión del agente quelante (quelante) e iones calcio. Esta constante puede determinarse mediante ITC (calorimetría isotérmica de titulación) como se describe

en AD Nielsen, CC Fuglsang y P Westh, *Analytical Biochemistry* vol. 314 (2003) pp. 227-234 y T Wiseman, S Williston, JF Brandts y L-N Lin, *Analytical Biochemistry* vol. 179 (1989) pp. 131-137.

5 Toda la cristalería y botellas de plástico utilizadas se lavan con una solución de EDTA al 1 % (p/p) y posteriormente se aclaran completamente en agua ultrapura tratada Chelex 100 (agua Milli-Q). Las soluciones se almacenan en botellas de plástico y se mantienen a 5 °C hasta su uso.

Tampones:

10 HEPES 20 mM (ácido 2-[4-(2 hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfónico), pH 8 preparado con agua ultrapura (agua Milli-Q)

Glicina 20 mM, pH 10 preparada con agua ultrapura (agua Milli-Q)

15 Soluciones:

- Quelante 125 µM en HEPES 20 mM, pH 8 o quelante 125 µM quelante en glicina 20 mM, pH 10

20 - CaCl₂ 4 mM en HEPES 20 mM, pH 8 o CaCl₂ 4 mM en glicina 20 mM, pH 10

- Agua ultrapura (agua Milli-Q)

25 Todos los tampones se pasan a través de columnas Quelex 100 (Sigma Aldrich C-7901, matriz 1 %, matriz de poliestireno reticulado, grupo activo ácido iminodiacético (forma sódica) unión de matriz a través del grupo metilo a anillos aromáticos) para eliminar los iones calcio. Todas las soluciones se desgasifican mediante agitación al vacío antes de los experimentos.

Instrumento:

30 MCS ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA, EE.UU.)

Procedimiento

35 La celda de referencia se llena con agua ultrapura (agua Milli-Q). La celda de muestra se llena con la solución quelante al pH seleccionado y la jeringa se llena con la solución de calcio al pH seleccionado. Las soluciones se equilibran hasta la temperatura deseada, por ejemplo, 19 °C.

40 A continuación, la solución quelante de la celda de muestra se valora volumétricamente con 30-40 alícuotas de 8 µl de la solución de calcio.

45 Las señales obtenidas de la ITC se integran a continuación utilizando el software Origin proporcionado por MicroCal Inc. Para obtener las isotermas de unión, se elaboran rutinas de regresión utilizando el mismo paquete informático. A continuación, estos datos se ajustan a un modelo utilizando las rutinas incorporadas al software Origin. Actualmente se prefiere el modelo de "OneSites" que proporciona el mejor ajuste para la mayoría de los agentes quelantes habitualmente utilizados, es decir, los residuos se distribuyen uniformemente alrededor de cero. A partir del valor K se calcula el log K como el logaritmo (base 10) del valor K.

Ensayos para determinar la capacidad limpiadora

50 Para evaluar la capacidad limpiadora de las variantes de alfa-amilasa en una composición detergente, pueden realizarse experimentos de lavado. Las enzimas se someten a ensayo utilizando el Automatic Mechanical Stress Assay (Ensayo automático de esfuerzo mecánico - AMSA) o la prueba de capacidad de lavado, utilizando vasos de precipitados. Con la prueba AMSA, puede examinarse la capacidad limpiadora de una gran cantidad de soluciones detergentes que contienen enzima de pequeño volumen. La placa AMSA tiene una serie de ranuras para soluciones de ensayo y una tapa que presiona con firmeza la muestra de tejido a lavar contra todas las aberturas de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, soluciones de ensayo, material textil y tapa, se agitan intensamente para poner la solución de ensayo en contacto con el material textil y aplicar tensión mecánica de una forma periódica oscilante. Para una descripción adicional, ver WO02/42740, especialmente el párrafo "Special method embodiments (Realizaciones especiales del método)" en la página 23-24.

60 Descripción general de la capacidad limpiadora:

65 Se preparó una solución de ensayo que comprendía agua (15°dH), detergente 0,8 g/l, por ejemplo, detergente A o B como se ha descrito anteriormente, o HCO₃⁻ 50 mM, y la enzima de la invención, por ejemplo, a una concentración de 0, 0,2, 0,4, 0,8 y/o 1,2 mg de proteína enzimática/l. Las telas manchadas con almidón (p. ej., CS-28 del Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT, Vlaarding, Países Bajos) se añaden y lavan durante 30 minutos a 20 °C.

Después del enjuague completo bajo agua corriente y secado en la oscuridad, se miden posteriormente los valores de intensidad de luz o de reflectancia de las telas manchadas como una medida de la capacidad limpiadora. El ensayo con 0 mg de proteína enzimática/l se utilizó como blanco para obtener un valor de remisión delta. Preferiblemente se aplica acción mecánica durante la etapa de lavado, por ejemplo, en forma de agitación, giro o revolución de la solución de lavado con la tela.

Los experimentos de capacidad limpiadora con AMSA pueden llevarse a cabo en las condiciones experimentales especificadas a continuación:

10	Detergente	Detergente modelo A o B
	Dosificación de detergente	0,8 g/l
	Volumen de la solución de ensayo	160 micro l
	pH	Tal cual
15	Tiempo de lavado	30 minutos
	Temperatura	20 °C
	Dureza del agua	15° dH
	Concentración de enzima en la solución de ensayo	0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 mg/l
20	Material de ensayo	CS-28 (Almidón de arroz sobre algodón)

La dureza del agua se ajustó a 15° dH mediante la adición de CaCl_2 , MgCl_2 , y NaHCO_3 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{HCO}_3^-$ = relación molar 4:1:7,5) al sistema de ensayo. Tras el lavado, los tejidos se enjuagaron con agua corriente y se secaron en la oscuridad.

La capacidad de la variante enzimática se mide como el brillo del color de la tela lavada con esa amilasa específica. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada desde la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra se mancha, la intensidad de la luz reflejada es menor al de la muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede utilizarse para medir la capacidad limpiadora de una amilasa.

Las mediciones de color se realizan con un escáner horizontal profesional (Kodak iQsmart, Kodak), que se utiliza para capturar una imagen del tejido lavado.

Para extraer un valor de intensidad de la luz a partir de las imágenes escaneadas, los valores de píxel de 24 bits de la imagen se convierten a valores de rojo (r), verde (g) y azul (b), también conocidos como valor de RGB. El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores de RGB entre sí como vectores y tomando a continuación la longitud del vector resultante:

$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

Textiles: Las muestras de tejidos CS-28 (almidón de arroz sobre algodón) pueden obtenerse del Center For Test materials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos.

La prueba de capacidad limpiadora utilizando vasos de precipitados es un ensayo en un modelo a pequeña escala de una lavadora de carga superior, y se utiliza para evaluar la eficacia de lavado de las amilasas. La prueba de capacidad limpiadora en vaso de precipitados, en la que se utilizan vasos de precipitados de 250 ml y un agitador de paletas que proporciona un movimiento oscilante de rotación, 180° en cada dirección, con una frecuencia de 80 por minuto, comprende las siguientes etapas: proporcionar 100 ml de solución de lavado (6 °C, 15° dH, pH 8,0) que contiene NaHCO_3 50 mM y enzima a 0,4 mg/l; agregar dos muestras de CS-28 (5x5 cm) y dos muestras de EMPA 162 (5x5 cm) a la solución de lavado para comenzar el lavado; configurar la velocidad de agitación a 80 rpm; detener la agitación al cabo de 60 minutos, aclarar las muestras con agua corriente fría; secar las muestras aclaradas en la oscuridad durante la noche; y evaluar la capacidad limpiadora midiendo la remisión de la luz incidente a 460 nm utilizando Color Eye como se describe a continuación.

Equipo y materiales

Baño de agua (5 °C) con circulación; Vasos de precipitados de vidrio (250 ml); un brazo giratorio por vaso de precipitados con capacidad de 100 ml de solución de lavado; muestras de ensayo: CS-28 (almidón de arroz sobre algodón) del Center for Testmaterials BV, Vlaardingen, Países Bajos y EMPA 162 (almidón de arroz sobre algodón/políéster) de EMPA Testmaterials AG, St. Gallen, Suiza, las muestras se cortan en 5x5 cm.

Solución de lavado: solución tampón de NaHCO_3 50 mM, pH 8,0, dureza del agua: 15° dH, relación Calcio:Magnesio de 4:1.

Solución madre de amilasa: 1 mg de proteína enzimática por ml. - Se utiliza una solución de 0,1 % (p/v) de Triton-x-100 y CaCl₂ 0,1 mM en agua ultrapura (agua MilliQ) para la dilución de amilasa (regulador de dilución de amilasa).

Medición con Color Eye

La capacidad limpiadora se expresa como un valor de remisión delta (ΔRem). Las evaluaciones de reflectancia de luz de las muestras se realizaron con un espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000 con una abertura oval muy pequeña, es decir, 0,7 cm² (~0,7 x 1,0 cm). Las mediciones se realizaron sin UV en la luz incidente y se extrajo la remisión a 460 nm. La muestra a medir se puso encima de otra muestra del mismo tipo antes de medirla para reducir el reflejo del pistón que empuja la muestra hacia arriba contra la abertura de medición. Los valores de remisión Delta se calcularon para muestras individuales restando el valor de remisión de la muestra lavada sin la amilasa añadida (control) del valor de remisión de la muestra lavada con amilasa.

Ensayos para la medición de la actividad amilolítica (actividad de alfa-amilasa)

Ensayo EnzChek

La actividad amilasa o la actividad amilasa residual pueden determinarse mediante el siguiente ensayo EnzCheck. El sustrato es un derivado de almidón de maíz, almidón DQ™ (conjugado de almidón de maíz BODIPY FL), que es almidón de maíz marcado con tinte BODIPY® FL (ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propiónico) en una medida tal que la fluorescencia se inactiva. Un vial que contiene aprox. 1 mg de sustrato liofilizado se disuelve en 100 µl de acetato sódico 50 mM pH 4,0. El vial se agita en vórtex durante 20 segundos y se deja a temperatura ambiente, en la oscuridad, con mezclado ocasional hasta que se disuelve. A continuación se añaden 950 µl de acetato sódico 10 mM, Triton X100 ((polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-feniléter 0,01 % (p/v) (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n (n - 9-10)), pH 5,0, se agita bien en vórtex y se almacena a temperatura ambiente, en la oscuridad hasta que esté lista para el uso. Partiendo de 1 ml de esta solución, se preparó la solución de trabajo de sustrato mezclando con 5 mL de HEPES 50 mM, Triton X100 0,01 % (p/v), CaCl₂ 1 mM, pH 7,0.

El detergente que contiene enzima se diluye a una concentración de 15 ng de proteína enzimática/ml (dilución de 6826,7 veces) en HEPES 50 mM, Triton X100 0,01 %, CaCl₂ 1 mM, pH 7,0.

Para el ensayo, se mezclan 25 µl de la solución de trabajo de sustrato durante 10 segundos con 25 µl de la enzima diluida en una placa de microtitulación de 384 pocillos negra. Se mide la intensidad de fluorescencia (excitación: 485 nm, emisión: 555 nm) una vez cada dos minutos durante 30 minutos en cada pocillo a 25 °C y se calcula $V_{\text{máx}}$ como la pendiente de la representación gráfica de intensidad de la fluorescencia frente al tiempo. El gráfico debe ser lineal y la prueba de actividad residual debe ajustarse de modo que la solución enzimática de referencia diluida esté dentro del intervalo lineal del ensayo de actividad.

En algunos casos, existe una interferencia significativa del detergente sin amilasa en el ensayo. En estos casos pueden utilizarse ensayos de amilasa alternativos. La interferencia de un detergente en un ensayo de amilasa puede analizarse añadiendo una cantidad conocida de amilasa al detergente en dos concentraciones y midiendo a continuación la actividad de ambas muestras. Si la diferencia en las actividades medidas corresponde a las diferencias en los niveles entre las amilasas añadidas, el ensayo puede utilizarse para determinar la actividad residual de la amilasa después del almacenamiento.

Ensayo PNP-G7

La actividad alfa-amilasa puede determinarse según un método en el que se emplea el sustrato PNP-G7. PNP-G7, que es una abreviatura de 4,6-etiliden(G₇)-p-nitrofenil(G₁)-α-D-maltoheptaósido, un oligosacárido bloqueado que se puede escindir con una endoamilasa, tal como una alfa-amilasa. Tras la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el kit digiere adicionalmente el sustrato hidrolizado liberando una molécula de PNP libre que tiene color amarillo y que por tanto puede medirse por espectrometría en el visible a $\lambda=405$ nm (400-420 nm). Los kits que contienen sustrato PNP-G7 y alfa-glucosidasa son fabricados por Roche/Hitachi (n.º. 11876473).

Reactivos:

El sustrato G7-PNP de este kit contiene 4,6-etiliden- G7-PNP 22 mM y HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfónico), pH 7,0) 52,4 mM.

El reactivo alfa-glucosidasa contiene HEPES 52,4 mM, NaCl 87 mM, MgCl₂ 12,6 mM, CaCl₂ 0,075 mM ≥ 4 KU/l de alfa-glucosidasa).

La solución de sustrato de trabajo se prepara mezclando 1 ml del reactivo alfa-glucosidasa con 0,2 ml del sustrato G7-PNP. Esta solución de sustrato de trabajo se prepara inmediatamente antes de usar.

Tampón de dilución: EPPS 50 mM, Triton X100 [polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-feniléter ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ ($n = 9-10$))), 0,01 % (p/v), $CaCl_2$ 1 mM, pH7,0.

Procedimiento:

La muestra de amilasa a analizar se diluyó en tampón de dilución para garantizar que el pH de la muestra diluida es 7. El ensayo se llevó a cabo transfiriendo 20 μ l de muestras de enzima diluida a una placa de microtitulación de 96 pocillos, y añadiendo 80 μ l de solución de trabajo de sustrato. La solución se mezcló y se preincubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se midió la absorción cada 20 s durante 5 minutos a una DO de 405 nm.

La pendiente (absorbancia por minuto) en la curva de absorción dependiente del tiempo es directamente proporcional a la actividad específica (actividad por mg de enzima) de la alfa-amilasa en cuestión en el conjunto de condiciones dado. La muestra de amilasa se debe diluir hasta un nivel en el que la pendiente está por debajo de 0,4 unidades de absorbancia por minuto.

Determinación del punto porcentual (pp)

La mejora en puntos porcentuales (pp) en la actividad residual (estabilidad) de la variante con respecto al precursor se calcula como la diferencia entre la actividad residual de la variante y la actividad residual del precursor, es decir, la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de variantes

Las variantes de amilasa de la Id. de sec. n.º: 6 SP722 se prepararon mediante procedimientos convencionales, en resumen: Introduciendo mutaciones aleatorias y/o dirigidas a sitio en el gen, transformando células huésped de *Bacillus subtilis* con los genes mutados, cultivando las células huésped transformadas (por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1 de WO 2004/111220) y purificando la amilasa a partir del caldo de fermentación. La amilasa de referencia (Id. de sec. n.º: 6) se produjo de forma recombinante en *Bacillus subtilis* de manera similar.

Ejemplo 2 Caracterización de agentes quelantes

Ejemplo 2a:

Medición de iones calcio libres

Los agentes quelantes (quelantes) pueden clasificarse por su capacidad para reducir la concentración de iones calcio libres (Ca^{2+}) de 2,0 mM a 0,10 mM a pH 8, medición desarrollada a partir de un método descrito por M.K. Nagarajan y col., JAOCS, vol. 61, n.º 9 (septiembre 1984), pp. 1475-1478. Se utilizó el ensayo descrito anteriormente en "Materiales y Métodos" para medir los iones calcio libres.

Por tanto, se determinó la concentración de quelante necesaria para reducir la dureza del agua de 2,0 mM a 0,10 mM como se ha descrito anteriormente. El experimento se llevó a cabo con el tampón de pH 8 a 21 °C.

Las concentraciones finales de quelante utilizadas y la concentración de Ca^{2+} libre medida se muestran a continuación en la Tabla I.

Tabla I

Concentración de Ca^{2+} libre determinada en una mezcla de Ca^{2+} 2,0 mM y varias cantidades de agente quelante a pH 8.

ml Solución madre de calcio	ml Solución de electrolito	ml Tampón pH 8	ml quelante;	mM concentración final de quelante
4	1	45,0	0,0	0,00
4	1	44,0	1,0	0,30
4	1	43,0	2,0	0,60
4	1	41,0	4,0	1,20
4	1	39,0	6,0	1,80
4	1	38,5	6,5	1,95
4	1	38,0	7,0	2,10
4	1	37,5	7,5	2,25
4	1	37,0	8,0	2,40
4	1	36,5	8,5	2,55

4	1	36,0	9,0	2,70
4	1	35,5	9,5	2,85
4	1	35,0	10,0	3,00
5	4	32,5	12,5	3,75
4	1	30,0	15,0	4,50
4	1	25,0	20,0	6,00
4	1	20,0	25,0	7,50
10	4	15,0	30,0	9,00
4	1	10,0	35,0	10,50

A partir de estos datos, la concentración de agente quelante necesaria para reducir la concentración de Ca^{2+} libre de 2,0 mM a menos de 0,10 mM se determinó por interpolación y los resultados se presentan en la Tabla II.

Se caracterizaron una serie de quelantes utilizando este ensayo, y en la tabla II se muestran las concentraciones de quelante necesarias para reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a pH 8,0 en tampón EPPS 49 mM y cloruro potásico 80 mM.

Tabla II

	mM	Con respecto a citrato
Citrato	8,36	1,00
EGTA	2,60	0,33
EDTA	1,90	0,21
HEDP	1,60	0,20
DTPA	1,87	0,24
DTPMP	1,17	0,15
MGDA	2,56	0,33

Ejemplo 2b

Determinación de log K

De forma alternativa, los agentes quelantes pueden caracterizarse mediante la constante de unión del agente quelante (quelante) y los iones calcio. Esta constante puede determinarse mediante ITC (calorimetría isotérmica de titulación) como se describe en AD Nielsen, CC Fuglsang y P Westh, *Analytical Biochemistry* vol. 314 (2003) pp. 227-234 y T Wiseman, S Williston, JF Brandts y L-N Lin, *Analytical Biochemistry* vol. 179 (1989) pp. 131-137. Se describe el procedimiento para determinar el log K

Utilizando este procedimiento, los siguientes valores log K se determinaron a pH 10 (ver la Tabla III):

Tabla III

	Log K	Log K con respecto a log K para el citrato
Citrato	3	1,00
EGTA	9	3,0
EDTA	8	2,7
HEDP	6	2,0
DTPA	7	2,7
MGDA	5	1,3

Ejemplo 3: Actividad residual tras incubación con agente quelante

Ensayo EnzChek

La actividad de amilasa o la actividad de amilasa residual se determina en la presente invención mediante el ensayo EnzCheck tal como se ha descrito anteriormente. En general, la actividad de amilasa residual en el detergente modelo B se determinó tras incubarlo a 31 °C durante 18 horas; la actividad se comparó a continuación con la actividad de una referencia incubada a 4 °C durante 18 horas como se ha descrito anteriormente.

Prueba de la estabilidad de variantes de amilasa en detergente con quelante

Para la determinación de la estabilidad de la amilasa en detergente, las enzimas objeto de ensayo se ajustaron a una concentración de 0,6 mg/ml de proteína enzimática por dilución en HEPES 20 mM, Triton X100 al 0,1 % (p/v), de pH 8,0. Si la concentración de amilasa inicial es demasiado baja, puede concentrarse mediante ultrafiltración (UF) utilizando una membrana de UF con un corte de 10 kDa.

Se transfirieron 25 µl de la solución de amilasa y 125 µl de detergente (detergente modelo B) a una placa de microtitulación de 96 pocillos en 4 réplicas. Se puso un imán pequeño (5 x 2 mm) en cada pocillo y la mezcla se mezcló durante 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador magnético. Se prepararon dos placas idénticas. Una de las placas se incubó a 4 °C durante 18 horas (muestra de referencia) y la otra placa se incubó a 31 °C durante 18 horas (muestra a 31 °C).

Inmediatamente tras la incubación, las muestras de las placas se analizaron en términos de actividad amilasa como se describe en el ensayo EnzCheck para determinar la actividad amilasa residual en detergentes. Cabe señalar que para reducir la interferencia de otros ingredientes detergentes aparte de la enzima en el ensayo, tanto la referencia como la muestra a 31 °C se diluyeron hasta la misma concentración proteica. La actividad tanto de las muestras de referencia como de las muestras de 31 °C se determinó en la misma placa de 384 pocillos. Se aseguró que la amilasa de referencia estuviera incluida en todas las placas de microtitulación del ensayo. La actividad residual se calculó como $100 \times V_{\text{máx}}(\text{muestra a } 31^\circ\text{C}) / V_{\text{máx}}(\text{muestra de referencia})$.

El resultado se muestra en la Tabla IV utilizando SP722 o SP722 + D183* G184* como amilasa de referencia (parental). La mejora en puntos porcentuales (pp) en la actividad residual de la variante con respecto a la parental se calcula como la diferencia entre el porcentaje de actividad residual de la variante y el de la parental.

Tabla IV (solo las variantes que tienen una sustitución en Y en la posición 206 se usan en las composiciones y métodos de la presente invención)

Enzima	Actividad residual (%)	Mejora en pp de la actividad residual con respecto a la parental	
		SP722	SP722 + D183* G184*
SP722 (parental)	12	0	-
SP722 + D183* G184* (parental)	65	53	0
SP722 + D183* G184* N195F	88	76	23
SP722 + D183* G184* N195L	79	67	14
SP722 + D183* G184* N195F	95	83	30
SP722 + D183* G184* N197L	81	69	16
SP722 + D183* G184* Y243F	80	68	15
SP722 + D183* G184* A186R, N195F	79	67	14
SP722 + D183* G184* H210Y	74	62	9
SP722 + D183* G184* V206L	91	79	26
SP722 + D183* G184* V213A	87	75	22
SP722 + Q174R* D183* G184, E212V	83	71	18
SP722 + D183* G184* V206L E212G G304V A447V	80	68	15
SP722 + N116T G133E K142R D183* G184* Y198N V206L	90	78	25
SP722 + G133E D183* G184* N195Y Y198N Y200F	83	71	18
SP722 + N116T D183* G184* N195Y Y198N	79	67	14
SP722 + K142R P146S G149K D183* G184* N195Y Y198N V206I	80	68	15
SP722 + D134Y D183* G184*	72	60	7
SP722 + T151R D183* G184* H210Y K320N R359I N418D	78	66	13
SP722 + G147E G149R Q169E D183* G184* Y198N Y203F V206L	87	75	22
SP722 + G133E G149R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	91	79	26
SP722 + G147E Y152H Q169E D183* G184* Y198N V206L	90	78	25
SP722 + D183* G184* N195F V206L	98	86	33
SP722 + D183* G184* N195F Y243F	100	88	35
SP722 + D183* G184* N195F H210Y	93	81	28
SP722 + D183* G184* V206L H210Y	95	83	30
SP722 + D183* G184* V213A	93	81	28
SP722 + D183* G184* S193T	85	73	20

	SP722 + D183* G184* A186T N195F	96	84	31
	SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F	94	82	29
	SP722 + D183* G184* V206L Y243F	98	86	33
5	SP722 + D183* G184* N195Y	93	81	28
	SP722 + G133D G149R D183* G184* Y198N V206L	92	80	27
	SP722 + N116T G133E G147E Y152H D183* G184* Y198N Y203F V206L	94	82	29
	SP722 + G147E G149R D183* G184* N195F Y198N V206L	96	84	31
10	SP722 + G133E K142R D183* G184* N195F Y198N	95	83	30
	SP722 + G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N V206L	97	85	32
	SP722 + N116T Q129L K142R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	101	89	36
	SP722 + G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	101	89	36
15	SP722 + N116T G133E G149R D183* G184* Y198N Y203F V206L	104	92	39
	SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	109	97	44
	SP722 + D183* G184* N195F V206C Y243F	113	101	48
	SP722 + D183* G184* N195F V206T Y243F	109	97	44
20	SP722 + D183* G184* N195F V206N Y243F	99	87	34
	SP722 + D183* G184* N195F V206C	101	89	36
	SP722 + D183* G184* N195F V206H	105	93	40
	SP722 + D183* G184* N195F V206Y	110	98	45
25	SP722 + D183* G184* N195F V206L	111	99	46
	SP722 + D183* G184* N195F V206G Y243F	104	92	39
	SP722 + D183* G184* V206F Y243F	104	92	39
	SP722 + D183* G184* N195F V206I Y243F	105	93	40
	SP722 + D183* G184* N195F V206F Y243F	92	80	27
30	SP722 + D183* G184* N195F V206S Y243F	104	92	39
	SP722 + D183* G184* A186T N195F	103	91	38
	SP722 + D183* G184* N195F V206L H210Y	102	90	37
	SP722 + D183* G184* S193T V206L	101	89	36
35	SP722 + D183* G184* S193T V213A	108	96	43
	SP722 + D183* G184* S193T Y243F	103	91	38
	SP722 + D183* G184* N195F V206N	107	95	42

Los resultados muestran claramente que las variantes de la invención son considerablemente más resistentes a la presencia de agentes quelantes fuertes que la alfa-amilasa de referencia. En algunos casos, la actividad residual es superior a 100, lo que refleja la varianza analítica del ensayo.

Los resultados muestran que las variantes también a pH 8,0, tienen una estabilidad mejorada en comparación con la alfa-amilasa de referencia, que puede ser SP722 de la Id. de sec. n.º: 6 o la Id. de sec. n.º: 6 + D183* G184*, que es la Id. de sec. n.º: 6 en donde se ha eliminado el aminoácido 183 y 184.

Ejemplo 4: Actividad residual tras incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10

En este ejemplo se usa el ensayo PNP-G7 arriba descrito para determinar la actividad de amilasa residual después de la incubación en presencia del agente quelante DTPA, pero el principio es el mismo que el anterior para determinar la actividad utilizando el ensayo EnzCheck. En general, la actividad amilasa residual se determinó tras la incubación en un tampón que contiene un agente quelante a pH 8 y a 49 °C o a pH 10 y 42 °C durante 1 hora, y la actividad se compara a continuación con la actividad de una referencia incubada a 4 °C durante 1 hora como se ha descrito anteriormente en "Materiales y Métodos".

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa después de la incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10 en tampón

Principio:

Se incubaron muestras de enzimas en tampón a pH 8,0 con una concentración final de 1,5 % de DTPA a 49 °C durante 1 h, y las muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante 1 h. Además, se incubaron muestras de enzimas en tampón a pH 10,0 con una concentración final de 1,5 % de DTPA a 42 °C durante 1 h y sus muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante 1 h. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

tampón a pH 8 con DTPA: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 %, DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n.º CAS 67-43-6), pH 8,0

tampón a pH 10 con DTPA: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 %, DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n.º CAS 67-43-6), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 8 con DTPA o tampón a pH 10 con DTPA) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de DTPA fue de 1,5 % en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una nueva placa de microtitulación de PCR (MTP de PCR), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR se incubó en el equipo de PCR durante 1 h a 49 °C, cuando el tampón tenía un pH de 8,0 (muestras a pH 8, 49 °C) y durante 1 h a 42 °C, cuando el tampón tenía pH 10,0 (muestras a pH 10, 42 °C).

Inmediatamente después de la incubación, las muestras en placas de PCR se diluyeron diez veces en tampón de dilución y se analizó el nivel de actividad de amilasa como se describe en el ensayo PNP-G7. Debe señalarse que para reducir la interferencia del agente quelante, aquí DTPA, en el ensayo, tanto la muestra de referencia como la de pH 8,49 °C/pH 10, 42 °C se diluyeron hasta la misma concentración antes de analizar la actividad residual. La actividad tanto de las muestras de referencia como de las muestras de pH 8, 49 °C o pH 10, 42 °C se determinó en la misma placa de 96 pocillos. Se aseguró que la amilasa parental estuviera incluida en todas las placas de microtitulación de ensayo. La actividad residual se calculó como $100 \cdot V_{\text{máx}}$ (muestra de pH 8, 42 °C o pH 10, 49 °C) / $V_{\text{máx}}$ (muestra de referencia) y los resultados se muestran en la Tabla V. Las mejoras en puntos porcentuales (pp) se calculan como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la original.

Tabla V (solo las variantes que tienen una sustitución por Y en la posición 206 se usan en las composiciones y métodos de la invención)

Enzima	Actividad residual (%)	pH 8, 49 °C		Actividad residual (%)	pH 10, 42 °C	
		Mejora en pp con respecto a la parental			Mejora en pp con respecto a la parental	
		SP722	SP722+D183* 184*		SP722	SP722+ D183* 184*
SP722 (parental)	1	0		8	0	
SP722 + D183* G184* (parental)	20	-	0	20	-	0
SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F	97	96	77	93	85	73
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	97	96	77	100	92	80
SP722 + D183* G184* N195F V206N Y243F	96	95	75	92	84	64
SP722 + D183* G184* N195F V206F Y243F	101	100	80	97	89	69
SP722 + D183* G184* N195F V206H	92	92	72	88	80	60
SP722 + D183* G184* N195F V206Y	95	94	74	96	88	68
SP722 + D183* G184* V206F Y243F	87	86	66	89	81	61
SP722 + D183* G184* N195F V206L H210Y	98	97	77	96	88	68
SP722 + D183* G184* S193T V206L	79	78	58	73	65	45
SP722+D183* G184* G133E G149R N195Y Y203F V206L	90	89	69	83	75	55

Los resultados muestran claramente que las variantes son altamente estables y tienen una actividad residual alta después de la incubación a pH 8 49 °C y pH 10 42 °C durante 1 hora, tanto cuando se comparan las actividades residuales de las variantes con la de la original y cuando se observa la mejora de las variantes en puntos porcentuales. En comparación, la amilasa SP722 + D183* G184* tiene una actividad residual de 20 % y SP722 tiene una actividad residual aún menor.

Ejemplo 5: Actividad residual después de la incubación en tampón con DTPA al 1,5 % (p/v) a pH8 y pH10

En este ejemplo el ensayo PNP-G7 descrito anteriormente se utiliza para determinar la actividad de amilasa residual de variantes SP722 después de la incubación en presencia del agente quelante de DTPA. En general la actividad de amilasa residual se determinó después de la incubación en un tampón que contenía un agente quelante a pH 8 o a pH 10 y a las temperaturas indicadas, y se comparan a continuación los tiempos de incubación y la actividad con la actividad de una referencia incubada a 4 °C como se ha descrito anteriormente en “Materiales y Métodos”.

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa después de la incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10 en tampón

Principio:

Las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 8,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA a la temperatura y tiempo de incubación que se indica a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Además, las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 10,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA a la temperatura y tiempo de incubación que se indica y sus muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

tampón a pH 8 con DTPA: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n.° CAS 67-43-6) 1,875 % (p/v), pH 8,0

tampón a pH 10 con DTPA: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n.° CAS 67-43-6) 1,875 % (p/v), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 8 con DTPA o tampón a pH 10 con DTPA) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de DTPA fue de 1,5 % (p/v) en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una placa de microtitulación (MTP), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR (muestra sometida a estrés) se incubó en el equipo de PCR tal como se indica más adelante en la tabla.

Inmediatamente después de la incubación, las muestras en placas de PCR se diluyeron diez veces en tampón de dilución y se analizó el nivel de actividad de amilasa como se describe en el ensayo PNP-G7. Debe observarse que para reducir la interferencia del agente quelante, aquí DTPA, en el ensayo, se diluyeron tanto la muestra de referencia como la sometida a estrés hasta la misma concentración antes de analizar la actividad residual. La actividad tanto de las muestras de referencia como de las muestras sometidas a estrés se determinó sobre la misma placa de 96 pocillos. Se aseguró que la amilasa parental estuviera incluida en todas las placas de microtitulación de ensayo. La actividad residual se calculó como $100 \cdot V_{\text{máx}} (\text{muestra sometida a estrés}) / V_{\text{máx}} (\text{muestra de referencia})$. La mejora en puntos porcentuales (pp) de la actividad residual de las variantes con respecto a la parental se calcula como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental. Los resultados se muestran en la tabla 5.1.

Tabla VI: Variantes SP722 (todas comparativas) con quelante DTPA

Enzima	pH 8, 49 °C, 10 minutos, DTPA 1,5 %		pH 10, 42 °C, 20 minutos, DTPA 1,5 %	
	Actividad residual (%)	Mejora en pp de la actividad residual con respecto a la parental	Actividad residual (%)	Mejora en pp de la actividad residual con respecto a la parental
SP722 (parental)	29	0	25	0
SP722 + N195F	51	22	42	17
SP722 + V206L	36	7	32	7
SP722 + V206Y	48	19	41	16

SP722 + Y243F	34	5	35	10
SP722 + N195F V206L	68	39	62	37
SP722 + N195F V206L Y243F	78	49	77	52

A partir de las actividades residuales se observa claramente que las variantes de SP722 son más estables en presencia de DTPA, lo que también se refleja en las mejoras en puntos porcentuales en la estabilidad de la variante en comparación con la parental.

Ejemplo 6: Actividad residual tras incubación con HEDP a pH 10

En este ejemplo se utiliza el ensayo PNP-G7 descrito anteriormente para determinar la actividad de amilasa residual después de la incubación en presencia del agente quelante HEDP. En general, la actividad de amilasa residual se determinó después de la incubación en un tampón que contenía un agente quelante a pH 10 y a las temperaturas indicadas, y se compara a continuación los tiempos de incubación y la actividad con la actividad de una referencia incubada a 4 °C como se ha descrito anteriormente en “Materiales y Métodos”.

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa tras incubación con agente quelante a pH 10 en tampón

Principio:

Las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 10,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

tampón a pH 10 con HEDP: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n.º CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 10 con HEDP) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de HEDP fue de 1,5 % (p/v) en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una placa de microtitulación (MTP), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR (muestra sometida a estrés) se incubó en el equipo de PCR tal como se indica más adelante en la Tabla 6.1. La actividad residual se calculó como $100 \cdot V_{\text{máx}} / V_{\text{máx}}$ (muestra sometida a estrés) / $V_{\text{máx}}$ (muestra de referencia). La mejora en puntos porcentuales (pp) de la actividad residual de las variantes con respecto a la parental se calcula como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Ejemplo 6: Estabilidad de SP722+D183* G184* y variantes de la misma con 1,5 % (p/v) de HEDP

En este ejemplo se utiliza el ensayo PNP-G7 descrito anteriormente para determinar la actividad de amilasa residual después de la incubación en presencia del agente quelante HEDP. En general la actividad de amilasa residual se determinó después de la incubación en un tampón que contenía un agente quelante a pH 8 o a pH 10 y a las temperaturas indicadas, y se comparan a continuación los tiempos de incubación y la actividad con la actividad de una referencia incubada a 4 °C como se ha descrito anteriormente en “Materiales y Métodos”.

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa después de la incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10 en tampón

Principio:

Las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 8,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Además, las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 10,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica y sus muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

tampón a pH 8 con HEDP: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n.º CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 8,0

- 5 tampón a pH 10 con HEDP: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n.º CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 8 con HEDP o tampón a pH 10 con HEDP) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de HEDP fue de 1,5 % (p/v) en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una placa de microtitulación (MTP), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR (muestra sometida a estrés) se incubó en el equipo de PCR tal como se indica más adelante en la Tabla 7.1. La actividad residual se calculó como $100 \times V_{\text{máx}}$ (muestra sometida a estrés) / $V_{\text{máx}}$ (muestra de referencia). La mejora en puntos porcentuales (pp) de la actividad residual de las variantes con respecto a la parental se calcula como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Tabla VIII: Variantes SP722+D183* G184* con HEDP (la variante SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F se usa en las composiciones y métodos de la invención)

Enzima	pH 8, 50 °C, 210 minutos, HEDP 1,5 %		pH 10, 42 °C, 60 minutos, HEDP 1,5 %	
	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental
SP722 + D183* G184* (parental)	16	0	16	0
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	96	80	95	79
SP722 + D183* G184* S193T V206L	61	45	62	46
SP722+D183* G184* G133E G149R N195Y Y203F V206L	82	66	74	58

Los resultados muestran claramente que las variantes de SP722+D183* G184* son mucho más estables cuando se incuban en presencia de HEDP como agente quelante.

Ejemplo 7: estabilidad de las variantes de AA560 en presencia de DTPA 1,5 % (p/v) o HEDP 1,5 % (p/v)

En este ejemplo se utiliza el ensayo PNP-G7 arriba descrito para determinar la actividad de amilasa residual después de la incubación en presencia del agente quelante DTPA o HEDP. En general la actividad de amilasa residual se determinó después de la incubación en un tampón que contenía un agente quelante a pH 8 o a pH 10 y a las temperaturas indicadas, y se comparan a continuación los tiempos de incubación y la actividad con la actividad de una referencia incubada a 4 °C como se ha descrito anteriormente en "Materiales y Métodos".

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa después de la incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10 en tampón

Principio:

Las muestras de enzima se incubaron en tampón a pH 8,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA o HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Además, las muestras de enzima se incubaron en tampón a pH 10,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA o HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica y sus muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

tampón a pH 8 con DTPA: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n.º CAS 67-43-6) 1,875 % (p/v), pH 8,0

tampón a pH 10 con DTPA: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n.º CAS 67-43-6) 1,875 % (p/v), pH 10,0

tampón a pH 8 con HEDP: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n.º CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 8,0

- 5 tampón a pH 10 con HEDP: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n.º CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 8 con DTPA o HEDP o tampón a pH 10 con DTPA o HEDP) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de DTPA o HEDP fue de 1,5 % (p/v) en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una placa de microtitulación (MTP), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR (muestra sometida a estrés) se incubó en el equipo de PCR tal como se indica más adelante en las Tablas 8.1 y 8.2 más adelante. La actividad residual se calculó como $100 \times V_{\text{máx}}$ (muestra sometida a estrés)/ $V_{\text{máx}}$ (muestra de referencia). La mejora en puntos porcentuales (pp) de la actividad residual de las variantes con respecto a la parental se calcula como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Tabla IX: Las variantes de AA560 con DTPA (solo la variante con una sustitución por Y en la posición 206 se usa en las composiciones y métodos de la invención)

	pH 8, 49 °C, 150 minutos, DTPA al 1,5 %		pH 10, 42 °C, 60 minutos, DTPA 1,5 %	
Enzima	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental
AA560 + 118K D183* G184* N195F R320K R458K (parental)	20	0	21	0
Parental + I206L	49	29	45	24
Progenitor + I206L	77	57	78	57
Progenitor + Y243F	31	11	36	15

Tabla 8,2: Las variantes de AA560 (solo la variante con una sustitución por Y en la posición 206 se usa en las composiciones y métodos de la invención) con HEDP

	pH 8, 50 °C, 210 minutos, HEDP 1,5 %		pH 10, 42 °C, 60 minutos, HEDP 1,5 %	
Enzima	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental
AA560 + 118K D183* G184* N195F R320K R458K (parental)	60	0	19	0
Parental + I206L	68	8	38	19
Progenitor + I206L	85	25	72	53
Progenitor + Y243F	59	-1	34	15

Ejemplo 8: Actividad residual tras incubación en detergente con agente quelante

En este ejemplo se utiliza el ensayo PNP-G7 para determinar la actividad amilasa residual tras la incubación en el detergente en presencia de agentes quelantes, como se describe en el ejemplo 5.

En general, la actividad amilasa residual se determinó tras la incubación en el detergente C que contiene los agentes quelantes DTPMP y HEDP a pH 8,2 al cabo de 3 semanas y 6 semanas a 30 °C. La actividad residual de la amilasa se compara a continuación con la actividad de la amilasa en el detergente recién preparado el día cero (antes de la incubación) como se describe a continuación.

Tabla X

Detergente C	Composición de detergente utilizada para las pruebas de estabilidad
Ingrediente	Composición (% en peso de la composición)
Alquilbenceno sulfonato C _{11,8}	5,89
Ácido cítrico	2,56
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	2,56
Alquil C ₁₂₋₁₄ etoxi 3 sulfato sódico	1,96
Alquil C ₁₄₋₁₅ -7-etoxilato	1,94
7-Etoxilato de alquilo C ₁₂₋₁₄	2,21
Ácido bórico	0,5
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	1,46
DTPMP (ácido dietilen triamino penta(metilenfosfónico))	0,19
HEDP (ácido hidroxietano difosfónico)	1,6
Proteasa*	0,059*
Etanol	1,95
Propilenglicol	1,5
Monoetanolamina	5,15
Agua, ingredientes estéticos (tintes, perfumes), reguladores del pH (hidróxido sódico) y componentes menores (enzimas, disolventes, agentes estructurantes, abrillantadores)	Equilibrar a pH 8,2

* comercializado con el nombre comercial Purafect Prime®, de Genencor International, Palo Alto. Esto se expresa como % de detergente que es enzima proteasa activa (es decir, % en el producto asume 100 % de actividad de la enzima).

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa tras incubación en el detergente C con agentes quelantes a pH 8,2

Método: Se prepararon muestras de detergente C, pH 8,2, que contenían, cada una, una variante de amilasa de la invención o la id. de sec. n.º 6 (SP722) con las siguientes dos delecciones D183* + G184*, también denotadas como SP722 + D183* + G184*. Se determinó para cada muestra de detergente la actividad enzimática residual inicial antes de la incubación (muestras de referencia).

La actividad enzimática residual de cada muestra se determinó después de la incubación a 30 °C durante 3 semanas y 6 semanas y se comparó con su muestra de referencia. Se determinó la actividad residual utilizando el ensayo de actividad de amilasa PNP-G7.

Soluciones de amilasa: 13,77 mg de proteína de amilasa activa en 100 g de detergente C, pH 8,2

Procedimiento:

Se puso detergente C, 5 g a pH 8,2, que contenía la amilasa por duplicado dentro de un frasco de vidrio de 7 ml con una tapa hermética al aire. Se determinó la actividad enzimática residual para las muestras iniciales, por duplicado, antes de la incubación.

Las muestras se pusieron en un incubador durante 3 semanas y 6 semanas a 30 °C. Inmediatamente después de la incubación, se analizaron las muestras residuales para determinar la actividad amilasa como se describe en el ensayo PNP-G7. En este ensayo la actividad residual de 100 % equivale a ausencia de pérdida de actividad de amilasa en comparación con la actividad enzimática residual inicial antes de la incubación (muestra de referencia). La mejora de punto porcentual (pp) en la actividad residual (estabilidad) de la variante con respecto a la parental se calcula como la diferencia entre la actividad residual de la variante y la actividad residual de la parental.

Tabla XI (Solo las variantes que tienen una sustitución por Y en la posición 206 se usan en las composiciones Y métodos de la invención)

	Actividad residual pH 8,2, 30 °C	Mejora en pp de la actividad residual con respecto a la parental
--	-------------------------------------	---

	3 semanas	6 semanas	3 semanas	6 semanas
SP722 + D183* G184* (parental)	19	3		
SP722 + D183* G184* N195F	67	47	48	44
SP722 + D183* G184* N195F H210Y	82	78	63	75
SP722 + D183* G184* N195F V206L	87	83	68	80
SP722 + D183* G184* N195F V206Y	98	97	79	94
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	100	97	81	94

Los resultados muestran claramente que las variantes de la invención son altamente estables y tienen una alta actividad residual después de la incubación en el detergente C a pH 8,2, 3 semanas y 6 semanas a 30 °C. En comparación, la amilasa SP722 + D183 * G184 * tiene una actividad residual de 19 % al cabo de 3 semanas y 3 % al cabo de 6 semanas

La invención descrita y reivindicada en la presente memoria no debe limitarse en alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, ya que estas realizaciones están destinadas como ilustraciones de varios aspectos de la invención.

No debe entenderse que las dimensiones y los valores descritos en la presente memoria estén estrictamente limitados a los valores numéricos exactos mencionados. En vez de eso, a menos que se especifique lo contrario, se pretende que cada una de tales dimensiones signifique tanto el valor mencionado como un intervalo funcionalmente equivalente en torno a ese valor. Por ejemplo, una dimensión descrita como “40 mm” se refiere a “aproximadamente 40 mm”.

REIVINDICACIONES

1. Una composición limpiadora que comprende:

(a) una variante de una alfa-amilasa original en donde la alfa-amilasa original es una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 6 y la variante es un polipéptido que tiene actividad amilolítica y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6 y comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 195, 193, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, en donde la secuencia de alfa-amilasa original se modifica mediante sustitución en la posición 206 por Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6; y
 (b) un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad desde el 0,01 hasta el 99,9 % en peso; y
 (c) al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0.

2. Una composición según la reivindicación 1, que comprende agente quelante en donde:

(a) el agente quelante a una concentración por debajo de 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide en cloruro de potasio 80 mM y ácido 4- (2-hidroxietil) piperazinasulfónico (EPPS) 49 mM a 21 °C y pH 8,0; y/o
 (b) el agente quelante a una concentración por debajo de 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide en el ensayo descrito en el ejemplo 2a; y/o
 (c) el agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración del agente quelante por debajo de 8 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4 mM; y/o
 (d) el agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración del agente quelante por debajo de 0,9 veces la concentración de citrato capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, medida a 21 °C y pH 8; y/o
 (e) el agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración del agente quelante por debajo de 0,7 veces, tal como por debajo de 0,5 veces, tal como por debajo de 0,3 veces la concentración de citrato capaz de reducir la concentración de iones calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM.

3. Una composición limpiadora según las reivindicaciones 1 a 2 que comprende al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración de agente quelante inferior a 0,9 veces la concentración de citrato capaz de reducir los iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, cuando se mide a 21 °C y pH 8,0.

4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(a) la variante comprende al menos dos sustituciones en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones 195, 193, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 o 243 en donde la secuencia de alfa-amilasa original se modifica en la posición 206 a Y, usando la numeración según la Id. de sec. n.º: 6; y/o
 (b) la secuencia de alfa-amilasa original se modifica mediante al menos una de las siguientes sustituciones: 193 es [G,A,S,T o M]; la posición 195 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 197 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 198 es [Q o N]; la posición 200 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 203 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 210 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 212 es [F, W, Y, L, I o V] o la posición 213 es [G, A, S, T o M]; o la posición 243 es [F,W,Y,L,I o V]; y/o
 (c) la secuencia de alfa-amilasa original se modifica mediante al menos una de las siguientes sustituciones: 193 es T; la posición 195 es F o Y; la posición 197 es F o L; la posición 198 es N; la posición 200 es F; la posición 203 es F; la posición 210 es Y; la posición 212 es V o la posición 213 es A; o la posición 243 es F y/o la variante que comprende además al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 (usando la Id. de sec. n.º: 6 para la numeración); y/o
 (d) la variante comprende una sustitución en 206 por Y y opcionalmente una o más posiciones correspondientes a las posiciones 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y una sustitución en una o más posiciones correspondientes a posiciones 116, 118, 129, 133, 142, 146, 147, 149,

151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6; y/o

(e) la variante tiene al menos un 60 % de actividad residual después de 18 horas a pH 8 y 31 °C en presencia de un agente quelante en donde dicho agente quelante en una concentración por debajo de 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0; y/o

(f) la variante tiene al menos un 70 % de actividad residual después de 18 horas a pH 8 y 31 °C en presencia de un agente quelante en donde dicho agente quelante en una concentración por debajo de 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0 y en el que la actividad residual se mide como se describe en "Materiales y métodos"; y/o

(g) la variante tiene un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la alfa-amilasa original cuando se mide en AMSA como se describe en "Materiales y métodos".

5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en: EDTA (etilendiamina tetraacetato), MGDA (ácido metilglucindiacético o N,N'-bis(carboximetil)alanina), EGTA (ácido etilenglicol tetraacético), DTPA (ácido dietilenetriamino pentaacético), DTPMP (ácido dietilentriamino penta(metilenfosfónico), HEDP (ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico) y mezclas de los mismos.

6. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde la variante de una alfa-amilasa original comprende una alteración en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 195, 197, 198, 200, 203, 210, 212, 213, 243 y que comprende además una alteración en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6; en donde

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

- (i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,
- (ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o
- (iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 6.

7. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde la variante de una alfa-amilasa original comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y que comprende además una alteración en 206 a Y y opcionalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consta de 195, 197, 198, 200, 203, 210, 212, 213, 243 y que comprende además una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consta de 116, 118, 129, 133, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 en donde

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

- (i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,
- (ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o
- (iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 6.

8. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde la variante tiene una estabilidad mejorada con respecto a la alfa-amilasa original o con respecto a la Id. de sec. n.º: 6 en una composición que comprende un agente quelante, en donde dicho agente quelante en una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0, preferiblemente en donde la variante tiene al menos 60 % de actividad residual después de 18 horas a pH 8 en presencia de un agente quelante en donde dicho agente quelante en una concentración por debajo de 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones de calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0, en donde la actividad residual se mide como se describe en "Materiales y métodos".

9. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde la variante que tiene actividad amilolítica tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, y más preferiblemente al menos un 95 % de identidad con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.
- 5 10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la amilasa es una variante de una alfa-amilasa parental, en donde la alfa-amilasa parental es la de la Id. de sec. n.º: 6, y la variante comprende las deleciones D183* y G184* y una de las siguientes series de mutaciones:

(a)N195F +V206Y;
10 (b)N195F +V206Y +Y243F;
(c)I206Y.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en: DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), HEDP (ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico), MGDA (ácido metilglicinadiacético o N,N'-bis(carboximetil)alanina), DTPMP (ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico) y mezclas de los mismos.
- 15 12. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el adyuvante de limpieza comprende uno o más de: microcápsula de perfume, agente de matizado de tejidos, proteasa, polímero de polietilenimina, lipasa, y cualquier mezcla de los mismos.
- 20 13. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es una composición detergente líquida para lavado de ropa.
- 25 14. Un método de lavado de ropa, que comprende lavar una prenda de vestir con una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, preferiblemente a una temperatura de 30 °C o menos, o más preferiblemente, a una temperatura de 20 °C o menos.