

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 360**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2009 E 18181027 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025 EP 3404088**

54 Título: **Composición detergente que comprende una variante de una xiloglucanasa de la familia 44**

30 Prioridad:

06.06.2008 US 131227 P

14.11.2008 US 114519 P

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

30.05.2025

73 Titular/es:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.00%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US**

72 Inventor/es:

**LANT, NEIL JOSEPH;
BESENMATTER, WERNER;
FRIIS, ESBEN PETER;
GIBSON, KEITH;
RASMUSSEN, FRANK WINTHER y
SKJØT, MICHAEL**

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 3 023 360 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 detergente que comprende una variante de una xiloglucanasa de la familia 44

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden una variante de una xiloglucanasa que pertenece a la familia 44 de las glicosilhidrolasas.

10 **Antecedentes de la invención**

El xiloglucano es un polisacárido estructural importante en la pared celular primaria (en crecimiento) de las plantas. Estructuralmente, los xiloglucanos consisten en una cadena principal de glucosa con enlaces beta-1,4 de tipo celulosa, que frecuentemente se sustituye con diversas cadenas laterales. Se cree que el xiloglucano funciona en la pared

15 primaria de las plantas mediante la reticulación de microfibrillas de celulosa, formando una red de celulosa-xiloglucano.

Las xiloglucanasas son capaces de catalizar la solubilización de xiloglucano a oligosacáridos de xiloglucano. Algunas xiloglucanasas presentan solamente actividad de xiloglucanasa, mientras que otras presentan tanto actividad de xiloglucanasa como de celulasa. Las xiloglucanasas pueden estar clasificadas en EC 3.2.1.4 o CE. 3.2.1.151. Las enzimas con actividad de xiloglucanasa se describen, por ejemplo, en Vincken y col. (1997) *Carbohydrate Research* 298(4):299-310, en donde se caracterizan tres endoglucanasas diferentes EndoI, EndoV y EndoVI de *Trichoderma viride* (similar a *T. reesei*). EndoI, EndoV y EndoVI pertenecen a la familia 5, 7 y 12 de las glicosilhidrolasas, respectivamente, véase Henrissat, B. y col. (1991, 1993). En WO 94/14953 se expone una xiloglucanasa de la familia 12 (EG II) clonada del hongo *Aspergillus aculeatus*. En WO 99/02663 se exponen xiloglucanasas clonadas de la familia 12 y la familia 5 de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus agaradhaerens*, respectivamente. En WO 01/062903 se exponen xiloglucanasas de la familia 44.

Especialmente en WO 99/02663 y en WO 01/062903 se sugiere que las xiloglucanasas se pueden utilizar en detergentes.

30 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición detergente que comprende una variante de xiloglucanasa que pertenecen a la familia 44 de las glicosilhidrolasas con propiedades mejoradas en comparación con su enzima precursora.

35 **Resumen de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición detergente como se define en la reivindicación 1. En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un uso de una xiloglucanasa como se define en la reivindicación 14. En las reivindicaciones dependientes se definen características adicionales de la invención.

40 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una xiloglucanasa precursora que tiene actividad de xiloglucanasa y potencialmente también actividad celulolítica. Las variantes de la presente invención tienen propiedades mejoradas en comparación con la xiloglucanasa progenitora. En un aspecto, las variantes tienen estabilidad mejorada en detergentes líquidos, especialmente composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa.

50 **Definiciones**

Actividad de xiloglucanasa: El término “actividad de xiloglucanasa” se define en la presente memoria como una hidrólisis de xiloglucanasa catalizada por enzimas. La reacción implica la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en xiloglucano. Para los fines de la presente invención, la actividad de xiloglucanasa se determina utilizando xiloglucano AZCL (de Megazyme) como sustrato de reacción. El ensayo se puede realizar de varias maneras, p. ej., como se describe en el ejemplo 2 de la presente solicitud o como se describe en WO 01/62903. Una unidad de actividad de xiloglucanasa (XyloU) se define como referencia al método de ensayo descrito en WO 01/62903, página 60, líneas 3 – 17.

60 **Actividad de celulasa:** El término “actividad de celulasa” se define en la presente memoria como una hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en beta-1,4-glucano (celulosa) catalizada por enzimas. Para los fines de la presente invención, la actividad de celulasa se determina utilizando AZCL- HE-celulosa (de Megazyme) como sustrato de reacción.

65 **Variante:** El término “variante” como se define en la reivindicación 1 se define en la presente memoria como un polipéptido que tiene actividad de xiloglucanasa que comprende una alteración, tal como una sustitución, inserción,

y/o delección, de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más (varias) posiciones específicas, posiciones que corresponden a las posiciones de aminoácidos en la Id. de sec. n.º: 3. Las variantes de la invención pueden también tener actividad de celulasa. El polipéptido alterado (variante) se obtiene por intervención humana mediante la modificación de la secuencia de polinucleótidos que codifica la enzima progenitora. La secuencia de polipéptidos de variante es preferiblemente una que no se encuentra en la naturaleza.

Enzima natural: El término xiloglucanasa “natural” significa una xiloglucanasa expresada por un microorganismo existente de forma natural, tal como una bacteria, levadura, u hongo filamentoso encontrado en la naturaleza. El término natural puede sustituirse indistintamente por el término “existente de forma natural”.

Enzima precursora: El término xiloglucanasa “precursora” o xiloglucanasa “progenitora” como se utiliza en la presente memoria significa una xiloglucanasa a la que se realiza una modificación, p. ej., sustitución o sustituciones, inserción o inserciones, delección o delecciones y/o truncamiento o truncamientos para producir las variantes de enzima de la presente invención. Este término también se refiere al polipéptido con el que se compara y alinea una variante. El precursor puede ser un polipéptido existente de forma natural (natural) y tiene la secuencia de la Id. de sec. n.º: 3. El polipéptido precursor puede, sin embargo, ser también una variante de un polipéptido existente de forma natural que ha sido modificado o alterado en la secuencia de aminoácidos. Un precursor puede ser también una variante alélica, que es un polipéptido codificado por cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico.

Variante aislada o polipéptido: El término “variante aislada” o “polipéptido aislado” como se utiliza en la presente memoria se refiere a una variante o un polipéptido que se aísla de una fuente, p. ej., la célula huésped a partir de la cual se expresa o del complejo enzimático en el que normalmente está presente. Preferiblemente, el polipéptido tiene una pureza de al menos 40 %, más preferiblemente una pureza de al menos 60 %, incluso más preferiblemente una pureza de al menos 80 %, lo más preferiblemente una pureza de al menos 90 % e, incluso lo más preferiblemente una pureza de al menos 95 %, según lo determinado por SDS-PAGE.

Variante o polipéptido prácticamente puro: El término “variante sustancialmente pura” o “polipéptido sustancialmente puro” significa en la presente memoria una preparación de polipéptido que contiene como máximo 10 %, preferiblemente como máximo 8 %, más preferiblemente como máximo 6 %, más preferiblemente como máximo 5 %, más preferiblemente como máximo 4 %, más preferiblemente como máximo 3 %, incluso más preferiblemente como máximo 2 %, lo más preferiblemente como máximo 1 % e, incluso lo más preferiblemente, como máximo 0,5 % en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma natural o recombinante. Se prefiere, por lo tanto, que la variante o polipéptido prácticamente puro tenga una pureza de al menos 92 %, preferiblemente una pureza de al menos 94 %, más preferiblemente una pureza de al menos 95 %, más preferiblemente una pureza de al menos 96 %, más preferiblemente una pureza de al menos 97 %, más preferiblemente una pureza de al menos 98 %, incluso más preferiblemente una pureza de al menos 99 %, lo más preferiblemente, una pureza de al menos 99,5 % e, incluso lo más preferiblemente, puro al 100 % en peso del material de polipéptido total presente en la preparación. Las variantes y polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando la variante o el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o mediante métodos de purificación clásicos.

Polipéptido maduro: El término “polipéptido maduro” se define en la presente memoria a un polipéptido que tiene actividad de xiloglucanasa que está en su forma final después de la traducción y modificaciones postraduccionales cualesquiera, tales como procesamiento del extremo N, truncamiento del extremo C, glucosilación, fosforilación, etc. La secuencia de xiloglucanasa madura teórica se muestra en la Id. de sec. n.º: 3.

Secuencia codificante de polipéptido maduro: El término “secuencia codificante de polipéptido maduro” se define en la presente memoria como una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de xiloglucanasa.

Identidad: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro “identidad”.

Para el objeto de la presente invención, el grado de identidad 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 y col., 2000, *Trends in Genetics* 16: 276-277; <http://emboss.org>), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. 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 el objeto de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, mencionado anteriormente) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y col., 2000, mencionado anteriormente; <http://emboss.org>), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. 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:

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

Fragmento funcional: El término “fragmento funcional de un polipéptido” se utiliza para describir un polipéptido derivado de un polipéptido más largo, *p. ej.*, un polipéptido maduro, y que ha sido truncado ya sea en la región N-terminal o en la región C-terminal o en ambas regiones para generar un fragmento del polipéptido precursor. Para ser un polipéptido funcional, el fragmento debe mantener al menos 20 %, preferiblemente al menos 40 %, más preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 %, lo más preferiblemente al menos 95 % e, incluso lo más preferiblemente, al menos 100 % de la actividad de xiloglucanasa del polipéptido de longitud total/maduro.

Variante alélica: El término “variante alélica” significa en la presente memoria cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Las variaciones alélicas surgen naturalmente mediante mutación, y pueden dar como resultado el polimorfismo entre poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

Polinucleótido aislado: El término “polinucleótido aislado” como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polinucleótido aislado de una fuente. En un aspecto, el polinucleótido aislado tiene una pureza de al menos 40 %, más preferiblemente una pureza de al menos 60 %, incluso más preferiblemente una pureza de al menos 80 % y, lo más preferiblemente, una pureza de al menos 90 %, e, incluso lo más preferiblemente, una pureza de al menos 95 %, determinada mediante electroforesis en agarosa.

Polinucleótido sustancialmente puro: La expresión “polinucleótido sustancialmente puro” como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de polinucleótido exenta de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para usar en sistemas de producción de polipéptidos genéticamente manipulados. Por lo tanto, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo 10 %, preferiblemente como máximo 8 %, más preferiblemente como máximo 6 %, más preferiblemente como máximo 5 %, más preferiblemente como máximo 4 %, más preferiblemente como máximo 3 %, incluso más preferiblemente como máximo 2 %, lo más preferiblemente como máximo 1 % e, incluso lo más preferiblemente, como máximo 0,5 % en peso de otro material de polinucleótido con el que está asociado de forma natural o recombinante. Un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir, sin embargo, regiones no traducidas 5' y 3' existentes de forma natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido prácticamente puro tenga una pureza de al menos 90 %, preferiblemente una pureza de al menos 92 %, más preferiblemente una pureza de al menos 94 %, más preferiblemente una pureza de al menos 95 %, más preferiblemente una pureza de al menos 96 %, más preferiblemente una pureza de al menos 97 %, incluso más preferiblemente una pureza de al menos 98 %, lo más preferiblemente, una pureza de al menos 99 % e, incluso lo más preferiblemente, una pureza de al menos 99,5 % en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están, preferiblemente, en una forma prácticamente pura, es decir, que la preparación del polinucleótido está prácticamente exenta de otro material polinucleótido con el cual está unido de forma nativa o recombinante. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

Secuencia codificante: Cuando se utiliza en la presente memoria el término “secuencia codificante” significa un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto polipeptídico. Los límites de la secuencia codificante generalmente están determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente se inicia con el codón de iniciación ATG o con codones de iniciación alternativos tales como GTG y TTG y finaliza con un codón de terminación tal como TAA, TAG, y TGA. La secuencia codificante puede ser un polinucleótido de ADN, ADNc, sintético o recombinante.

Operativamente unido: La expresión “operativamente unido” significa en la presente memoria una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición adecuada con respecto a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótido de tal forma que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

Célula huésped: El término “célula huésped”, como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier tipo celular susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con una construcción de ácido nucleico o un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término “célula huésped” abarca cualquier

progenie de una célula precursora que no sea idéntica a la célula precursora debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

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 tales 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 en detergente mejorada es, especialmente, una estabilidad mejorada de la actividad de xiloglucanasa cuando una variante de xiloglucanasa de la presente invención se mezcla en una formulación detergente líquida y a continuación se almacena a temperaturas de entre 15 y 50 °C.

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

Convenciones para la designación de variantes

Para los fines de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de la xiloglucanasa expuesta en la Id. de sec. n.º: 3 se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otra xiloglucanasa. La secuencia de aminoácidos de otra xiloglucanasa está alineada con la secuencia de aminoácidos de la xiloglucanasa expuesta en la Id. de sec. n.º: 3 y, basándose en la alineación, se puede determinar el número de posición del aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la xiloglucanasa expuesta en la Id. de sec. n.º: 3.

Se puede realizar un alineamiento de secuencias polipeptídicas, por ejemplo, utilizando “ClustalW” (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680). Un alineamiento de secuencias de ADN se puede realizar utilizando el alineamiento de polipéptidos como una plantilla, reemplazando los aminoácidos con el codón correspondiente de la secuencia de ADN.

En la descripción de las diversas variantes de xiloglucanasa de la presente invención, la nomenclatura que se describe más adelante está adaptada para facilitar la referencia. En todos los casos, se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o en triplete aceptada por la IUPAC.

Sustituciones. Para una sustitución de aminoácidos se usa la siguiente nomenclatura: aminoácido original/posición/aminoácido sustituido. Por lo tanto, la sustitución de treonina por alanina en la posición 226 se designa como “Thr226Ala” o “T226A”. Las mutaciones múltiples se separan por signos de adición (“+”), p. ej., “G205R + S411F”, que representan mutaciones en las posiciones 205 y 411 que sustituyen glicina (G) por arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente. En donde un aminoácido original puede sustituirse por un aminoácido seleccionado de un grupo que se designa como “K129R,S,A,I,F,Q” que representa la sustitución de una lisina (K) en la posición 129 con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: arginina (R), serina (S), alanina (A), isoleucina (I), fenilalanina (F) y glutamina (Q). Alternativamente, “K129R,S,A,I,F,Q” podría escribirse como K129R o K129S, o K129A, o K129I o K129F o K129Q.

Deleciones. En las deleciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original/posición/asterisco (*). Por lo tanto, la delección de glicina en la posición 195 se designa como “Gly195*” o “G195*”. Las deleciones múltiples están separadas por signos de suma (“+”), p. ej., “G195* + S411*”.

Inserciones. En las inserciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Asterisco (*)/posición/letra minúscula/aminoácido insertado, en donde la letra minúscula indica la adición de un aminoácido corriente abajo del número de posición. En consecuencia, la inserción de un ácido glutámico (E) corriente abajo de la posición 10 se designa “*10aE”. Si la inserción de un segundo aminoácido, p. ej., una valina (V), es corriente abajo de la posición 10 después de ácido glutámico (E), se designa “*10aE +*10bV”. Las adiciones en el extremo N-terminal del polipéptido se designan con un 0 (cero). La adición de un ácido glutámico (E) y una valina (V) añadida al aminoácido N-terminal de un polipéptido se designa como *0aE+*0bV.

Xiloglucanasas precursoras

Las xiloglucanasas precursoras prácticamente homólogas pueden tener una o más (varias) alteraciones de aminoácidos, tales como sustituciones, deleciones y/o inserciones. Estos cambios son, preferiblemente, de naturaleza minoritaria, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento tridimensional o actividad de la proteína o polipéptido; pequeñas deleciones, de forma típica, de uno a aproximadamente 9 aminoácidos, preferiblemente de uno a aproximadamente 15 aminoácidos y, lo más preferiblemente, de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones terminales de amino o carboxilos, tales como un residuo de metionina terminal de amino, un pequeño péptido enlazante de hasta

aproximadamente cinco a diez residuos, preferiblemente de 10 a 15 residuos y, lo más preferiblemente, de 20 a 25 residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como un tracto de polihistidina o proteína A (Nilsson y col., 1985, *EMBO J.* 4: 1075; Nilsson y col., 1991, *Methods Enzymol.* 198: 3. Véase también, en general, Ford y col., 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

Los ejemplos de sustituciones conservativas están dentro del grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). En la técnica se conocen sustituciones de aminoácidos que no alteran generalmente la actividad específica y han sido descritas, por ejemplo, por Neurath y Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New 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.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de xiloglucanasa de la presente invención pueden identificarse según procedimientos conocidos en la técnica tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-1085, 1989). En esta última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo en la molécula y en las moléculas mutantes resultantes se analiza la actividad biológica (es decir, la actividad de xiloglucanasa) para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton y col., *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708, 1996. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también puede ser determinado mediante análisis físico de la estructura, determinado mediante técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o etiquetado de fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos de sitios de contacto putativos. Véase, por ejemplo, de Vos y col., *Science* 255:306-312, 1992; Smith y col., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver y col., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas del análisis de homologías con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención. La estructura cristalina de una enzima que pertenece a las glicosilhidrolasas de la familia 44 ha sido publicada por Kitago y. col., *J. Biol. Chem.* Vol. 282:35703-35711, 2007. Basándose en esta estructura, es posible generar una estructura tridimensional de la xiloglucanasa precursora (Id. de sec. n.º: 3) in silicio. Basándose en la comparación con la estructura publicada, se han identificado los siguientes residuos en la Id. de sec. n.º: 3 como críticos para la función enzimática E187 (catalítica - ácido/base), E358 (catalítica - nucleófila), E56 (Ca²⁺ de coordinación a grupo carboxilato) y D154 (Ca²⁺ de coordinación a grupo carboxilato). Estas posiciones deben, por lo tanto, preferiblemente no ser mutadas en la enzima precursora.

La xiloglucanasa precursora consiste en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 3.

Un fragmento de un polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 3 es un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos eliminados del extremo terminal amino y/o carboxilo de esta secuencia de aminoácidos y que continúa manteniendo la actividad de xiloglucanasa.

Las enzimas parentales también pueden ser variantes alélicas de los polipéptidos que tienen actividad de xiloglucanasa.

La secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 3 o un fragmento de la misma; se puede utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica xiloglucanasas precursoras a partir de cepas de géneros o especies diferentes según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden utilizar para hibridación con ADN genómico o ADNc del género o especie de interés, según los procedimientos de transferencia de Southern normalizados, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deberían tener al menos 14, preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35 y, lo más preferiblemente, al menos 70 nucleótidos de longitud. Sin embargo, se prefiere que la sonda de ácido nucleico tenga al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede tener al menos 200 nucleótidos, preferiblemente al menos 300 nucleótidos, más preferiblemente al menos 400 nucleótidos o, lo más preferiblemente, al menos 500 nucleótidos de longitud. Se pueden utilizar sondas incluso más largas, p. ej., sondas de ácido nucleico que tienen una longitud de preferiblemente al menos 600 nucleótidos, más preferiblemente al menos 700 nucleótidos, incluso más preferiblemente al menos 800 nucleótidos, preferiblemente al menos 900 nucleótidos de longitud, preferiblemente al menos 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente al menos 1100 nucleótidos de longitud, preferiblemente al menos 1200 nucleótidos de longitud, preferiblemente al menos 1300 nucleótidos de longitud, preferiblemente al menos 1400 nucleótidos de longitud, preferiblemente al menos 1500 nucleótidos de longitud o, lo más preferiblemente, al menos 1600 nucleótidos de longitud. Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas son normalmente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina, o avidina). Dichas sondas están abarcadas en la presente invención.

Puede analizarse una biblioteca de ADN genómico de otros organismos de este tipo para la determinación de ADN que se hibrida con las sondas descritas anteriormente y codifica una xiloglucanasa precursora. El ADN genómico o ADN procedente de otros organismos de este tipo se puede separar mediante electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e

inmovilizar sobre nitrocelulosa u otro material de soporte adecuado. Por ejemplo, para identificar un clon o ADN que sea homólogo con la Id. de sec. n.º: 1, o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una membrana de Southern. Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda nucleotídica marcada correspondiente al polinucleótido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, su cadena complementaria o una subsecuencia de la misma, en condiciones de rigurosidad baja a muy alta. Las moléculas con las que la sonda se hibrida se pueden detectar usando, por ejemplo, una película de rayos X o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de rigurosidad de muy baja a muy alta se definen como prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado, y bien formamida al 25 % para rigurosidad muy baja y baja, formamida al 35 % para rigurosidad media y media-alta, o formamida al 50 % para rigurosidad alta y muy alta, siguiendo procedimientos convencionales de transferencia de Southern durante un período de 12 a 24 horas, de forma óptima.

Para sondas largas de una longitud de al menos 100 nucleótidos, el material de soporte se lava finalmente tres veces cada 15 minutos utilizando 2X SSC, SDS al 0,2 %, preferiblemente a 45 °C (rigurosidad muy baja), más preferiblemente a 50 °C (rigurosidad baja), más preferiblemente a 55 °C (rigurosidad media), más preferiblemente a 60 °C (rigurosidad media-alta), incluso más preferiblemente a 65 °C (rigurosidad alta) y, lo más preferiblemente, a 70 °C (rigurosidad muy alta).

Para sondas cortas que tienen una longitud de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, las condiciones de rigurosidad se definen como prehibridación, hibridación y lavado poshibridación a una temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 10 °C por debajo de la T_m utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:1390) en NaCl 0,9 M, Tris-HCl 0,09 M pH 7,6, EDTA 6 mM, NP-40 0,5 %, solución de 1X Denhardt, pirofosfato sódico 1 mM, fosfato monobásico sódico 1 mM, ATP 0,1 mM, y 0,2 mg de ARN de levadura por ml después de procedimientos de transferencia de Southern durante un período de 12 a 24 horas de forma óptima.

Para sondas cortas que tienen una longitud de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, el material de soporte se lava una vez en 6X SSC más SDS al 0,1 % durante 15 minutos y dos veces cada uno durante 15 minutos usando 6X SSC a una temperatura de 5 °C a 10 °C por debajo de la T_m calculada.

La xiloglucanasa precursora se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. En un aspecto, la xiloglucanasa precursora es secretada extracelularmente.

En un aspecto adicional la xiloglucanasa precursora puede ser una xiloglucanasa bacteriana. Por ejemplo, la xiloglucanasa puede ser un polipéptido de bacteria Gram positiva tal como *Bacillus*, preferiblemente de la subdivisión Bacillus/Lactobacillus, preferiblemente una especie del género Paenibacillus, especialmente Paenibacillus polymyxa, p. ej., Paenibacillus polymyxa, ATCC 832, preferiblemente la xiloglucanasa es una xiloglucanasa de la familia 44, p. ej., como se describe en WO 01/62903.

Generación de variantes

Las variantes de una xiloglucanasa precursora se pueden preparar según cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis aleatoria y/o dirigida al sitio, constructo génico sintético, constructo génico semisintético, mutagénesis al azar, barajado, etc.

El constructo génico sintético conlleva la síntesis in vitro de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar una molécula de polipéptido de interés. La síntesis de genes se puede realizar utilizando diversas técnicas, tales como la tecnología multiplexada basada en microchip descrita por Tian, y col., (Tian y col., *Nature* 432:1050-1054) y tecnologías similares, en donde los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

El constructo génico semisintético se lleva a cabo combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos, y/o la mutagénesis dirigida al sitio, y/o la mutagénesis aleatoria, y/o el barajado. La construcción semisintética se tipifica por un proceso en el que se utilizan fragmentos de polinucleótido que se han sintetizado, en combinación con técnicas de PCR. Por lo tanto, las regiones definidas de los genes se pueden sintetizar *de novo*, mientras que otras regiones se pueden amplificar utilizando cebadores mutagénicos específicos de sitio, mientras que otras regiones adicionales se pueden someter a amplificación por PCR propensa a error o PCR no propensa a error. A continuación, las subsecuencias de polinucleótido se pueden barajar.

La mutagénesis dirigida al sitio es una técnica en la que se crean una o varias mutaciones en un sitio definido en una molécula de polinucleótido que codifica la xiloglucanasa precursora. La técnica puede realizarse *in vitro* o *in vivo*.

La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo in vitro mediante PCR que implica el uso de cebadores de oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis dirigida al sitio también se puede llevar a cabo

in vitro mediante mutagénesis por inserción de un casete que implica la escisión mediante una enzima de restricción en un sitio del plásmido que comprende un polinucleótido que codifica la xiloglucanasa precursora y la posterior unión de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite crear extremos adherentes en el plásmido e inserciones para unirlos entre sí. Para una descripción adicional de técnicas adecuadas consúltese Sambrook y col. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. y col. [eds.] "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., y Cutting, S. M. (ed.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990), y WO 96/34946; Scherer y Davis, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4949-4955; y Barton y col., 1990, *Nucleic Acids Research* 18: 7349-4966.

Después de la reacción de ligasa, la mezcla de unión se puede utilizar para transformar una célula huésped, para fines de clonación muchas veces se utilizan células de *E. coli*, tal como se describe en Ausubel, F. M. y col. Las células de *E. coli* transformadas pueden propagarse en medios líquidos o sobre placas de agar, los plásmidos se pueden rescatar de las células transformadas y utilizarse para transformar células de *B. subtilis*. Las células de *Bacillus* competentes, tales como MB1510, un derivado 168 (p. ej., comercializado por BGSC con n.º de acceso 1A1 168 trpC2), se pueden transformar como se describe en WO 03/095658. Se puede utilizar un casete de integración de plásmidos de *E. coli* para la construcción de la biblioteca para la transformación de *Bacillus*. El método se describe en detalle en WO 03/095658. Alternativamente, se puede utilizar un producto de PCR-SOE amplificado in vitro (Melnikov y Youngman, *Nucleic Acid Research* 27, 1056).

La mutagénesis dirigida al sitio también puede tener lugar in vivo mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense 2004/0171154; Storici y col., 2001, *Nature Biotechnology* 19: 773-776; Kren y col., 1998, *Nat. Med.* 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, *Fungal Genet. Newslett.* 43: 15-16.

Se puede usar cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio en la presente invención. Existen muchos kits comerciales disponibles que se pueden utilizar para preparar variantes de xiloglucanasas precursoras.

Pueden realizarse y analizarse múltiples sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguido por un procedimiento de cribado relevante, tal como el expuesto en Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen la técnica de PCR propensa a error, expresión en fago (p. ej., Lowman y col., 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; US-5.223.409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire y col., 1986, *Gene* 46:145; Ner y col., 1988, *DNA* 7:127).

Los métodos de mutagénesis/barajado como se ha descrito anteriormente se pueden combinar con métodos de análisis automáticos de alto rendimiento para detectar la actividad de los polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped, p. ej., Bacillos, como se ha descrito anteriormente. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos con actividad de xiloglucanasa se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente utilizando métodos convencionales en la técnica.

Variantes

En la presente invención, las variantes aisladas de una xiloglucanasa precursora comprenden una alteración en una o más (varias) posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones número 68, 123, 156, 118, 200, 129, 137, 193, 92, 83, 149, 34, 340, 332, 9, 76, 331, 310, 324, 498, 395, 366, 1, 374, 7, 140, 8, 14, 21, 211, 37, 45, 13, 78, 87, 436, 101, 104, 111, 306, 117, 119, 414, 139, 268, 142, 159, 164, 102, 168, 176, 180, 482, 183, 202, 206, 217, 4, 222, 19, 224, 228, 232, 2, 240, 244, 5, 247, 249, 328, 252, 259, 406, 267, 269, 275, 179, 166, 278, 281, 288, 298, 301, 18, 302, 165, 80, 303, 316, 169, 322, 120, 146, 342, 348, 147, 353, 380, 468, 382, 383, 38, 384, 389, 391, 10, 392, 396, 177, 397, 399, 409, 237, 413, 253, 415, 418, 40, 443, 445, 148, 449, 225, 450, 454, 3, 455, 456, 299, 461, 470, 204, 476, 488, 347 y 507, en donde la variante comprende una alteración en 156, en donde la variante que tiene actividad de xiloglucanasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos el 75 %, preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, incluso más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 97 %, lo más preferiblemente al menos el 98 % e incluso más preferiblemente el 99 % de la secuencia de aminoácidos de la xiloglucanasa precursora. La numeración de las posiciones es relativa a la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º 3. 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 xiloglucanasa precursora.

La variante comprende una o más (varias) de las siguientes combinaciones de alteraciones:

I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T104A+Q137E+N153K+R156Q+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+N415S+D420G+T421I+S424H+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*;

ES 3 023 360 T3

I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+T104A+Q137E+R156Q+V159A+H164N+N168K+T172A+I22
 2V+V228I+D249N+V272A;
 K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P;
 5 D37G,N+K129A+R156Y;
 Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;
 Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F;
 Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H;
 10 Q68H+K118R+R156F,Y;
 Q68H+K118R+R156Y+G200P;
 Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F;
 Q68H+K129A,T+R156K+G200P+N331F;
 15 Q68H+R156F,V,Y+G200P+N331F;
 Q68H+R156Y;
 Q68H+R156Y+H193T;
 Q68H+R156Y+H193T+D366H;
 20 Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V;
 Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;
 Q68H+T92A,D,I,S,V,Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;
 Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;
 25 Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F;
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F;
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T;
 30 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H;
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K;
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H,K,Q;
 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T;
 35 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H;
 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V;
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T;
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N;
 40 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T;
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L;
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;
 Q68H+T92V+K118A,R+R156Y,F;
 Q68H+T92V+K118A+S123P,T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;
 45 Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H;
 Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C;
 Q68H+T92V+R156F,V,Y+G200P+M310V;
 Q68H+T92V+R156F,V,Y+G200P+M310V+N331F;
 50 Q68H+T92V+R156F,Y+H193T;
 Q68H+T92V+R156F,Y+H193T+D366H;
 Q68H+T92V+R156F,Y+H193T+G200P+M310V;
 Q68H+T92V+R156Y;
 55 G78A+K118A++K129A+R156Y;
 G78A+K118A+K129A+R156Y;
 G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;
 G78A+K118A+K129A+R156Y+K169A;
 60 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y;
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A;
 T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;
 65 T92V+K118A+K129A+R156Y;
 T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;

T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F;
 T92V+K129A+R156Y;
 T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y;
 5 K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F;
 K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;
 K118A+K129A+R156Y;
 K118A+K129A+R156Y+A224P;
 10 K118A+K129A+R156Y+G200P;
 K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F;
 K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;
 K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I;
 15 K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F;
 K118A+K129A+R156Y+K470T;
 K118A+R156Y;
 K118A+R156Y+G200P;
 20 S123T+K129A+R156Y;
 K129A+Q137E+R156Y;
 K129A+Q137E+R156Y+G200P;
 K129A+Q137E+R156Y+K470T;
 25 K129A+Q137E+V139K+N140F+Q147S+R156Y;
 K129A+R156Y;
 K129A+R156Y+A177T+V179I+A183S;
 K129A+R156Y+A328G;
 30 K129A+R156Y+D247G;
 K129A+R156Y+D249G,N,S;
 K129A+R156Y+D303I,K,S,V;
 K129A+R156Y+D324N;
 35 K129A+R156Y+D366H+T374A;
 K129A+R156Y+D461N,Q,T;
 K129A+R156Y+E288Q;
 K129A+R156Y+G200P;
 40 K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K;
 K129A+R156Y+H164N;
 K129A+R156Y+H436Y;
 K129A+R156Y+I10V+V14I+D19E;
 45 K129A+R156Y+I222V+A224P+V228I+V232A;
 K129A+R156Y+K176P,S;
 K129A+R156Y+K275T;
 K129A+R156Y+K322I+K454Q;
 50 K129A+R156Y+K406N+N415G;
 K129A+R156Y+K454Q;
 K129A+R156Y+L380F+N383Y+D384G+N389T;
 K129A+R156Y+N298F+E299N+G301T;
 55 K129A+R156Y+N302K+D303L,S;
 K129A+R156Y+N331F;
 K129A+R156Y+P507A;
 K129A+R156Y+R267H;
 K129A+R156Y+R409L,T;
 60 K129A+R156Y+S443D+K445S+L449I+V450I+S455N+M456Y;
 K129A+R156Y+T244D;
 K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y;
 K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A;
 65 R156A,E,F,I,K,M,Q,T,V,W,Y; o

R156Y+N331F.

En un aspecto, la cantidad de alteraciones de aminoácidos en las variantes de la presente invención comprende preferiblemente el número total de 55, preferiblemente 52, más preferiblemente 50, más preferiblemente 40, más preferiblemente 30, más preferiblemente 20, más preferiblemente 15, más preferiblemente diez, más preferiblemente nueve, más preferiblemente ocho, incluso más preferiblemente siete, incluso más preferiblemente seis, incluso más preferiblemente cinco, incluso más preferiblemente cuatro, incluso más preferiblemente tres y, lo más preferiblemente, dos alteraciones y, lo más preferiblemente, una alteración. En otro aspecto el número total de alteraciones es uno, preferiblemente dos, más preferiblemente tres, incluso más preferiblemente cuatro, incluso más preferiblemente cinco, incluso más preferiblemente seis, incluso más preferiblemente siete, incluso más preferiblemente ocho, incluso más preferiblemente nueve, lo más preferiblemente diez. La alteración está en forma de i) una inserción de un aminoácido corriente abajo del aminoácido que ocupa la posición; ii) delección del aminoácido que ocupa la posición, o iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición con un aminoácido diferente. Las alteraciones pueden estar hechas independientemente entre sí, por ejemplo, en una posición puede haber una inserción y en cambio en una segunda posición una sustitución y en una tercera posición una delección en comparación con la xiloglucanasa progenitora. En una realización preferida, la variante solo comprende sustituciones.

En un aspecto de la invención, las posiciones a ser mutadas se identifican basándose en un análisis de secuencia de consenso. El análisis se realiza alineando la Id. de sec. n.º 3, con la Id. de sec. n.º 5 y la Id. de sec. n.º 7, así como con otras secuencias de la base de datos Uniprot que son idénticas en un 30 % a la región de la glicosilhidrolasa de la familia 44 de la Id. de sec. n.º 3. Las secuencias de consenso resultantes se muestran en la Figura 1. La secuencia de consenso 1 es la secuencia que comprende el aminoácido más abundante en una posición dada desde el alineamiento, la secuencia de consenso 2 es la secuencia con el 2º aminoácido más abundante en una posición dada y así sucesivamente. En un aspecto de la invención, uno o más (varios) residuos de la Id. de sec. n.º 3 se reemplazan por el residuo correspondiente de la secuencia de consenso 1 o la secuencia de consenso 2 o la secuencia de consenso 3 o la secuencia de consenso 4.

En otro aspecto de la invención la variante es generada cambiando los aminoácidos en el péptido progenitor que tienen una carga positiva y están situados a no más de 20 Å de ion calcio a aminoácidos con carga neutra o negativa. Las variantes preferidas de la presente invención comprenden variantes en las que la carga total a no más de 20 Å del ion calcio se ha hecho más negativa. En tales variantes, puede haberse remplazado los aminoácidos con carga positiva por aminoácidos con carga neutra o negativa en las condiciones de aplicación. De este modo, las variantes preferidas pueden tener un residuo de aminoácidos que está cargado positivamente parcial o totalmente en las condiciones de "estabilidad química" o de aplicación, es decir, un Lys, Arg o His reemplazado por un aminoácido negativo o neutro. Los aminoácidos de sustitución preferidos pueden ser aminoácidos cargados negativamente como Asp y Glu o aminoácidos neutros como Ala, Asn, Gln, Tyr, Trp y Phe.

Preferiblemente, la variante comprende una sustitución en la posición 129 y en la posición 156.

En otro aspecto, una variante de una xiloglucanasa precursora comprende alteraciones en tres o más (varias) posiciones que corresponden a las posiciones 156 y 68 o 123 o 118 o 200 o 129 o 137 o 193 o 92 o 76 o 331.

En otro aspecto, una variante de una xiloglucanasa precursora comprende alteraciones en cuatro o más (varias) posiciones que corresponden a las posiciones 156 y 68 o 123 o 118 o 200 o 129 o 137 o 193 o 92 o 76 o 331.

En otro aspecto, una variante de una xiloglucanasa precursora comprende alteraciones en cinco o más (varias) posiciones que corresponden a las posiciones 156 y 68 o 123 o 118 o 200 o 129 o 137 o 193 o 92 o 76 o 331.

En otro aspecto, una variante de una xiloglucanasa precursora comprende alteraciones en seis o más (varias) posiciones que corresponden a las posiciones 156 y 68 o 123 o 118 o 200 o 129 o 137 o 193 o 92 o 76 o 331.

En otro aspecto, una variante de una xiloglucanasa precursora comprende alteraciones en siete o más (varias) posiciones que corresponden a las posiciones 156 y 68 o 123 o 118 o 200 o 129 o 137 o 193 o 92 o 76 o 331.

En otro aspecto, una variante de una xiloglucanasa precursora comprende alteraciones en las posiciones que corresponden a las posiciones 129 y 156 y 331 y 200 y 118.

En otro aspecto, una variante de una xiloglucanasa precursora comprende alteraciones en las posiciones que corresponden a las posiciones 68 y 129 y 156 y 331 y 200 y 118.

En otro aspecto, una variante de una xiloglucanasa precursora comprende alteraciones en las posiciones que corresponden a las posiciones 68 y 92 y 129 y 156 y 331 y 200 y 118.

En otro aspecto la variante comprende una o más (varias) sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: Q68H,N,L; S123P,T; R156Y,F,V,I,K,W,L,M; K118A,R; G200P,E,S,D; K129T,A,S; Q137E; H193T,S,D; T92V,I,A,S; A83E; Q149E; L34F,I,V; R340T,N; S332P; T9D; S76W,V,I,K,R,T; N331F,C; M310I,V,L; D324N; G498A,D; D395G y

D366H. Preferiblemente, las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en Q68H; S123P; R156Y,F; K118A; G200P,E; K129T,A; Q137E; H193T; T92V y N331F. Más preferiblemente, las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en Q68H; S123P; R156Y,F; K118A; G200P,E; K129T,A; Q137E; T92V y N331F. Más preferiblemente, la variante contiene una sustitución en nueve u ocho, siete o seis o cinco o cuatro o tres o dos o una posición o posiciones, donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en Q68H; S123P; R156Y,F; K118A; G200P,E; K129T,A; Q137E; T92V y N331F.

En un aspecto adicional, la variante comprende una de las siguientes combinaciones de sustituciones:

- 10 R156Y
Q68H+R156Y
K129A+R156Y
S123T+K129A+R156Y
- 15 K129A+R156Y+G200P
Q68H+K118R+R156F
Q68H+R156Y+H193T
Q68H+R156F+G200P+N331F
- 20 Q68H+T92V+K118A+R156Y
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F
- 25 K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F
T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A
- 30 Q68H+T92V+Q137E+R156Y+G200P+N331F
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
- 35 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H
- 40 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
Q68H+T92V+K118A+S123P,T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F

- 45 Todas las variantes descritas anteriormente son variantes de una xiloglucanasa precursora que pertenece a la familia 44 de glicosilhidrolasas, y la xiloglucanasa precursora consiste en la Id. de sec. n.º: 3.

Composiciones

- 50 La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una variante de xiloglucanasa o un polipéptido que tiene actividad de xiloglucanasa de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en tal variante o polipéptido. El término “enriquecido” significa que la actividad de xiloglucanasa de la composición se ha aumentado, p. ej., con un factor de enriquecimiento de 1,1 o más. Preferiblemente, las composiciones se formulan para proporcionar características deseables, tales como poco color, poco olor y estabilidad aceptable durante el almacenamiento.

- 55 La composición puede comprender una variante o polipéptido de la presente invención como componente enzimático principal, p. ej., una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasas.

- 65 Las composiciones de polipéptido se pueden preparar según métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una formulación líquida o seca. Por ejemplo, el polipéptido puede estar formulado en forma de un granulado o un

microgranulado. La variante o polipéptido a incluir en la composición se puede estabilizar según métodos conocidos en la técnica. En una realización preferida la xiloglucanasa variante está formulada en una composición líquida.

Usos

5

La presente invención se refiere también a métodos de uso de las variantes de xiloglucanasa.

10

Las xiloglucanasas variantes se incorporan preferiblemente en y/o se utilizan junto con composiciones detergentes, por ejemplo en composiciones detergentes para lavado de ropa, por ejemplo composiciones detergentes para lavado doméstico de ropa, especialmente composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa. La composición detergente comprende de forma típica 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, p. ej., como se describe en las patentes WO2007/130562 y WO2007/149806.

15

La composición detergente puede estar en cualquier forma, tal como un sólido, líquido, gel o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente la composición está en forma líquida, preferiblemente una composición detergente líquida para lavado de ropa.

20

Un aspecto de la invención es el uso de una variante de xiloglucanasa o de una composición de variante de xiloglucanasa de la invención junto con una composición detergente para transmitir ventajas de capacidad contra la formación de bolitas y/o de suavidad de los tejidos y/o de aclarado del color y/o de retirada de suciedad y/o antirredépósito de la suciedad y/o de inhibición de transferencia de colorantes a un tejido o prenda.

25

Además, la invención se refiere a un proceso para el lavado de tejidos que comprende tratar tejidos con una solución de lavado que contiene una composición detergente y una variante de xiloglucanasa o una composición de variante de xiloglucanasa de la invención. El tratamiento de lavado puede realizarse, por ejemplo, en un proceso de lavado a máquina o en un proceso de lavado manual. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, una solución acuosa de lavado que contiene la composición detergente y con un pH de entre 3 y 12.

30

Durante el lavado y el uso, la superficie de los tejidos o prenda de forma convencional quedará contaminada con fragmentos de fibras rotas o sueltas que pueden proporcionar al tejido un aspecto descolorido y desgastado. La retirada de estas fibras de superficie del tejido restablecerá parcialmente los colores originales y el aspecto del tejido, dando lugar a una aclaración del color y a un aspecto mejorado. Se puede utilizar una variante de xiloglucanasa o una composición de variante de xiloglucanasa de la invención para proporcionar aclaración del color y/o un aspecto mejorado mediante el uso de ciclos de lavado únicos o múltiples (repetidos).

35

Además, las microfibrillas que sobresalen de la superficie de la tela se pueden agrupar en pelotitas, denominadas bolitas o pelusas, que quedan adheridas a la superficie y alteran el aspecto del tejido. Una variante de xiloglucanasa o composición de variante de xiloglucanasa de la invención se puede utilizar para eliminar tales bolitas, un efecto que se denomina eliminación de bolitas.

40

La aclaración del color y la eliminación de bolitas se pueden evaluar mediante inspección visual utilizando un panel de grupo de ensayo. Los efectos también pueden medirse mediante reflexión de luz o mediante determinación de pelusas de algodón mediante mediciones ópticas. Estos métodos son generalmente conocidos en la técnica y se describen brevemente en *Enzymes in Detergency*, 1997, publicado por Marcel Dekker, página 139 a página 140.

45

Especialmente con un número creciente de ciclos de lavado, los depósitos, que pueden incluir suciedad en forma de partículas, suciedad soluble, tintes y pigmentos y sales insolubles, se acumulan en las superficies de la fibra textil. Esto puede dar lugar a un deterioro visible de la capacidad limpiadora percibida de los tratamientos de lavado, por ejemplo, dando lugar a un aspecto grisáceo o amarillento del tejido. Esto puede evitarse utilizando una variante de xiloglucanasa o composición variante de xiloglucanasa de la invención en los ciclos de lavado. Este efecto se denomina antirredépósito o inhibición de la transferencia de colorantes o retirada de suciedad y puede evaluarse mediante mediciones ópticas.

50

La suciedad o las partículas de sal insolubles atrapadas en la superficie del tejido y entre las fibras pueden hacer que el tejido se vuelva rígido. El tejido se puede suavizar mediante la incorporación de una variante de xiloglucanasa o composición variante de xiloglucanasa de la invención en los ciclos de lavado.

55

Los tejidos sometidos a los métodos de la presente invención pueden ser ropa para lavar convencional, por ejemplo, ropa para lavar del ámbito doméstico. Preferiblemente, la mayor parte de la ropa para lavar está constituida por prendas y tejidos, incluidos tejidos de punto, telas tejidas, prendas vaqueras, hilos y toallas, de algodón, mezclas de algodón o materiales celulósicos naturales o artificiales (p. ej., procedentes de pulpa de madera) o mezclas de los mismos. Son ejemplos de mezclas las mezclas de algodón o rayón/viscosa con uno o más materiales acompañantes, tales como lana, fibras sintéticas (p. ej., fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de poli(alcohol vinílico), fibras de cloruro de polivinilo, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida) y fibras que contienen celulosa (p. ej., rayón/viscosa, ramio, lino/linaza, yute, fibras de acetato de celulosa, liocel).

60

65

Se reconoce que el tratamiento de telas y/o prendas con una solución detergente que contiene la variante de xiloglucanasa o la composición de variante de xiloglucanasa de la invención puede ser particularmente relevante en relación con, por ejemplo, la producción de nuevas fibras y/o telas y/o prendas, y también durante el lavado de telas y/o prendas usadas, por ejemplo, durante los procesos de lavado doméstico o en procesos de lavado institucional.

La dosificación de la variante de xiloglucanasa o la composición de variante de xiloglucanasa de la presente invención y otras condiciones, en las cuales se utiliza la composición, incluida la composición y concentración de la solución detergente, pueden estar determinadas a partir de métodos conocidos en la técnica.

Las xiloglucanasas pueden utilizarse en las composiciones de la presente invención para efectuar la retirada de suciedad que contiene derivados de celulosa o hemicelulosa, mejorar el antirredépósito y mejorar la liberación de la suciedad. Las xiloglucanasas también pueden utilizarse en las composiciones de la presente invención para transmitir ventajas de liberación de suciedad al algodón durante un proceso de lavado posterior. La ventaja de liberación de suciedad se observa en el tejido de algodón y en todo tipo de tejidos que comprenden una cantidad significativa de algodón, tales como mezclas sintéticas de algodón - (p. ej. poliéster, poliamida tal como NylonTM y elastano).

Composición detergente para lavado de ropa

La composición detergente para lavado de ropa de la presente invención comprende una variante aislada de una xiloglucanasa precursora. La variante aislada de una xiloglucanasa precursora se ha descrito anteriormente en la presente memoria con mayor detalle. La composición preferiblemente comprende un polímero limpiador de grasa alcoxilado anfifílico específico. La composición preferiblemente comprende tensioactivo detergente, preferiblemente bajos niveles de tensioactivo detergente. El polímero limpiador de grasa anfifílico alcoxilado específico se describe en mayor detalle a continuación. El tensioactivo detergente se describe en mayor detalle a continuación. La composición comprende preferiblemente un copolímero aleatorio de injerto. Se describen copolímeros aleatorios de injerto adecuados en mayor detalle a continuación.

Preferiblemente, la composición comprende un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n)(CH₃)-N⁺-C_xH_{2x}-N⁺-(CH₃)-bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo.

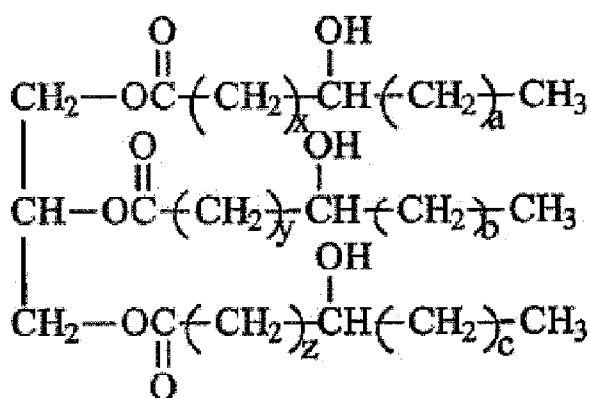
Preferiblemente, la composición comprende microcápsulas de perfume, preferiblemente el perfume está encapsulado en una película de melamina-formaldehído.

La composición detergente preferiblemente comprende de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,2 % en peso, de aproximadamente 0,00008 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 0,04 % en peso de agente de matizado de tejidos. La composición puede comprender de 0,0001 % en peso a 0,2 % en peso de agente de matizado de tejidos, esto puede ser especialmente preferido cuando la composición está en forma de una bolsa de dosis unitaria.

La composición detergente para lavado de ropa puede tener cualquier forma, tal como de sólido, líquido, gel o cualquier combinación de los mismos. La composición puede estar en forma de pastilla o bolsa, incluyendo bolsas multicompartimentales. La composición puede estar en forma de polvo de flujo libre, tal como un aglomerado, polvo seco por pulverización, encapsulado, extrudido, aguja, fideo, copo o cualquier combinación de los mismos. Sin embargo, es preferible que la composición esté en forma de un líquido. De forma adicional, la composición está en forma tanto isotrópica como anisotrópica. Preferiblemente, la composición, o al menos parte de la misma, está en una fase laminar.

La composición preferiblemente comprende bajos niveles de agua, tales como de 0,01 % en peso a 10 % en peso, preferiblemente a 5 % en peso, preferiblemente a 4 % en peso, o a 3 % en peso, o a 2 % en peso, o incluso a 1 % en peso. Esto se prefiere especialmente si la composición está en forma de bolsa, estando de forma típica al menos parcialmente, preferiblemente completamente en una película soluble en agua. Preferiblemente, la película soluble en agua comprende poli(alcohol vinílico).

La composición puede comprender un estructurante, tal como un aceite de ricino hidrogenado. Un tipo adecuado de agente estructurante que se utiliza especialmente en las composiciones de la presente invención comprende materiales cristalinos funcionalizados con hidroxilo no poliméricos (salvo en lo que respecta a la alcoxilación convencional). Estos materiales estructurantes forman de forma típica una red intermolecular de tipo hebra asociada en la totalidad de la matriz líquida, que de forma típica cristaliza en el interior de la matriz *in situ*. Los estructurantes preferidos son ácidos grasos, ésteres grasos o ceras grasas cristalinos que contienen hidroxilo. Los estructurantes adecuados se seleccionarán, de forma típica, de los que tienen la siguiente fórmula:



en donde:

(x + a) está entre 11 y 17;

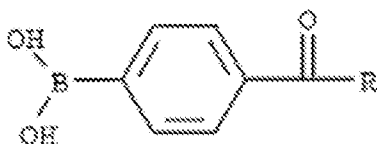
(y + b) está entre 11 y 17; y

(z + c) está entre 11 y 17.

Preferiblemente, en esta fórmula x = y = z = 10 y/o a = b = c = 5.

Ejemplos específicos de estructurantes que contienen hidroxilo, cristalinos preferidos incluyen aceite de ricino y sus derivados. Se prefieren especialmente los derivados de aceite de ricino hidrogenados tales como aceite de ricino hidrogenado y cera de ricino hidrogenada. Los estructurantes que contienen hidroxilo, cristalinos, derivados de aceite de ricino comercialmente disponibles incluyen THIXCIN de Rheox, Inc. (ahora Elementis).

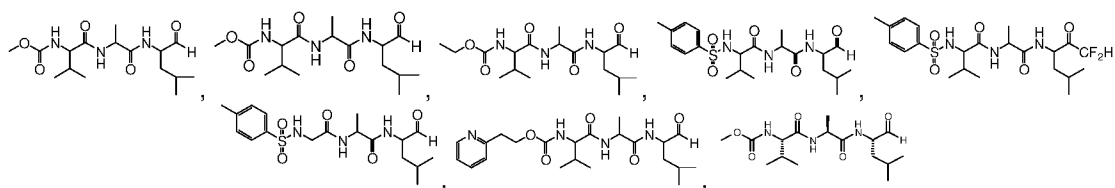
La composición también comprende preferiblemente alcanolamina para neutralizar los componentes ácidos. Los ejemplos de alcanolaminas adecuadas son trietanolamina y monoetanolamina. Esto es especialmente preferido cuando las composiciones comprenden estabilizadores de proteasas tales como ácido bórico o derivados del mismo tal como ácido borónico. Los ejemplos de derivados de ácido borónico adecuados son derivados de ácido fenilborónico de la siguiente fórmula:



en donde R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo de C₁-C₆, alquilo sustituido de C₁-C₆, alquenilo de C₁-C₆ y alquenilo sustituido de C₁-C₆.

Un estabilizador de la proteasa muy preferido es ácido 4-formil-fenilborónico. Otros derivados adicionales de ácido borónico adecuados como estabilizadores de proteasas se describen en US-4.963.655, US-5.159.060, WO 95/12655, WO 95/29223, WO 92/19707, WO 94/04653, WO 94/04654, US-5.442.100, US-5.488.157 y US-5.472.628.

La composición puede comprender un inhibidor de proteasas peptídico reversible. Preferiblemente, el inhibidor de proteasas peptídico reversible es un inhibidor enzimático tripeptídico. Los ejemplos no limitativos ilustrativos de un inhibidor enzimático tripeptídico adecuado incluyen:



y mezclas de los mismos.

El inhibidor de proteasas peptídico reversible se puede preparar de cualquier manera adecuada. Los ejemplos no limitativos ilustrativos de procesos adecuados para fabricar el inhibidor de proteasas peptídico reversible se pueden encontrar en la patente US-6.165.966.

En una realización, la composición comprende de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 5 %, específicamente de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 3 %, más específicamente de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 1 %, en peso de la composición, del inhibidor de proteasas peptídico reversible.

La composición comprende preferiblemente un disolvente. El disolvente es de forma típica agua o un disolvente orgánico o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el disolvente es una mezcla de agua y un disolvente orgánico. Si la composición está en forma de una bolsa de dosis unitaria, entonces preferiblemente la composición comprende un disolvente orgánico y menos de 10 % en peso, o 5 % en peso, o 4 % en peso, o 3 % en peso de agua libre, e incluso puede ser anhidra, típicamente no comprende agua libre añadida de forma deliberada. El agua libre se mide, de forma típica, con una valoración de Karl Fischer. 2 g de la composición detergente para lavado de ropa se extrae en 50 ml de metanol seco a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se analiza 1 ml del metanol mediante valoración de Karl Fischer.

La composición puede comprender de más de 0 % en peso a 25 % en peso, o de más de 0 % en peso a 20 % en peso, o de más de 0 % en peso a 15 % en peso, o de más de 0 % en peso a 10 % en peso, o de más de 0 % en peso a 8 % en peso, preferiblemente de más de 0 % en peso a 5 % en peso, lo más preferiblemente de más de 0 % en peso a 3 % en peso de disolvente orgánico. Los disolventes adecuados incluyen éteres y diéteres de C₄-C₁₄, glicoles, glicoles alcoxilados, glicol éteres de C₆-C₁₆, alcoholes aromáticos alcoxilados, alcoholes aromáticos, alcoholes alifáticos ramificados, alcoholes alifáticos ramificados alcoxilados, alcoholes de C₁-C₅ lineales alcoxilados, alcoholes C₁-C₅ lineales, aminas, alquilos e hidrocarburos y halohidrocarburos de alquilo y cicloalquilo de C₈-C₁₄, y mezclas de los mismos.

Los disolventes preferidos se seleccionan de metoxi octadecanol, 2-(2-etoxietoxi)etanol, alcohol bencílico, 2-etilbutanol y/o 2-metilbutanol, 1-metilpropoxietanol y/o 2-metilbutoxietanol, alcoholes C₁-C₅ lineales tales como metanol, etanol, propanol, butil diglicol éter (BDGE), butiltriglicol éter, alcohol terc-amílico, glicerol, isopropanol y mezclas de los mismos. Los disolventes especialmente preferidos que pueden utilizarse en la presente memoria son butoxipropoxipropanol, butildiglicol éter, alcohol bencílico, butoxipropanol, propilenglicol, glicerol, etanol, metanol, isopropanol y mezclas de los mismos. Otros disolventes adecuados incluyen propilenglicol y dietilenglicol y mezclas de los mismos.

La composición preferiblemente comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 %, en peso de la composición, de un secuestrante de calcio que tiene una constante de estabilidad condicional a pH 8 superior a aproximadamente 4. En una realización, la composición, preferiblemente en forma líquida, puede contener un secuestrante de calcio que tiene una constante de estabilidad condicional a pH 8 superior a aproximadamente 4. El secuestrante de calcio con una constante de estabilidad condicional a pH 8 superior a aproximadamente 4 puede formar complejos solubles con iones Ca. En una realización, el secuestrante de calcio se selecciona de 1-hidroxietilideno, ácido 1,1-di-fosfónico (HEDP), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA) y combinaciones de los mismos. La información adicional sobre los secuestrantes de calcio y sus constantes de estabilidad se puede encontrar en "Keys to Chelation with Versene Chelating Agents" publicadas por Dow Company, ver las tablas 4.4, 4.5, 4.6, 4.7. y el boletín técnico de Monsanto 53-39(E) ME-2.

Composición detergente para lavado de ropa sólida

En una realización de la presente invención, la composición es una composición detergente para lavado de ropa sólida, preferiblemente una composición detergente para lavado de ropa sólida en polvo.

La composición, preferiblemente, comprende de 0 % en peso a 10 % en peso, o incluso hasta 5 % en peso, de aditivo reforzante de la detergencia de tipo zeolita. La composición, también preferiblemente, comprende de 0 % en peso a 10 % en peso, o incluso 5 % en peso de aditivo reforzante de la detergencia de tipo fosfato.

La composición comprende de forma típica un tensioactivo detergente aniónico, preferiblemente un alquibenceno sulfonato lineal, preferiblemente junto con un tensioactivo auxiliar. Los tensioactivos auxiliares preferidos son sulfatos de alquiletoxilato que tienen un grado de etoxilación promedio de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 3, y/o alcoholes etoxilados con un grado de etoxilación promedio de 1 a 10, preferiblemente de 3 a 7.

La composición, preferiblemente, comprende quelante, preferiblemente la composición comprende de 0,3 % en peso a 2,0 % en peso de quelante. Un quelante adecuado es el ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico (EDDS).

La composición puede comprender polímeros de celulosa, tales como sales de sodio o potasio de carboximetilcelulosa, carboxietil celulosa, sulfoetil celulosa, sulfopropil celulosa, sulfato de celulosa, celulosa fosforilada, carboximetil

hidroxietilcelulosa, carboximetil hidroxipropil celulosa, sulfoetil hidroxietil celulosa, sulfoetil hidroxipropil celulosa, carboximetil metil hidroxietilcelulosa, carboximetil metil celulosa, sulfoetil metil hidroxietilcelulosa, sulfoetil metil celulosa, carboximetil etil hidroxietilcelulosa, carboximetil etil celulosa, sulfoetil etil hidroxietilcelulosa, sulfoetil etil celulosa, carboximetil metil hidroxipropil celulosa, sulfoetil metil hidroxipropil celulosa, carboximetil dodecil celulosa, carboximetil dodecil celulosa, carboximetil cianoetil celulosa, y sulfoetil cianoetil celulosa. La celulosa puede ser una celulosa sustituida con dos o más sustituyentes diferentes tales como metil e hidroxietilcelulosa.

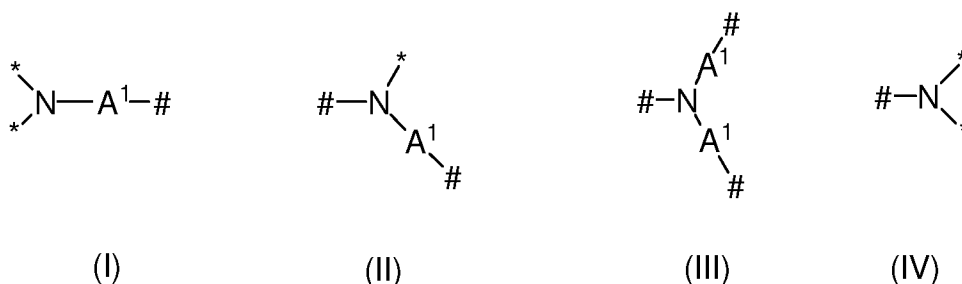
La composición puede comprender polímeros para la liberación de la suciedad, tales como Repel-o-Tex™. Otros polímeros para la liberación de la suciedad adecuados son polímeros aniónicos para la liberación de la suciedad. Se han descrito polímeros adecuados para la liberación de la suciedad en mayor detalle en las patentes WO05123835A1, WO07079850A1 y WO08110318A2.

La composición puede comprender un polvo seco por pulverización. El polvo seco por pulverización puede comprender una sal de silicato, tal como el silicato sódico.

Polímeros anfífilicos alcoxilados para limpiar grasa

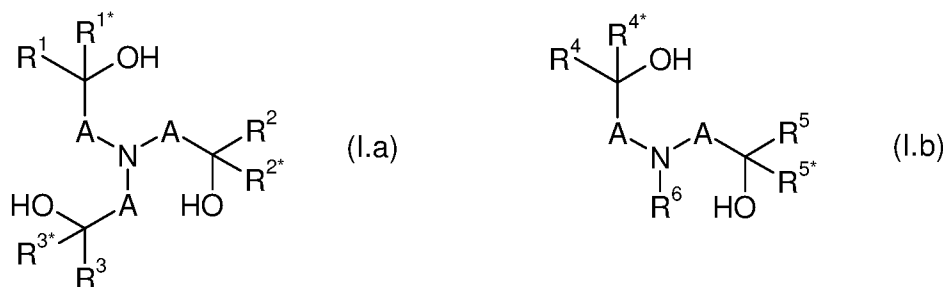
Los polímeros limpiadores de grasa anfífilicos alcoxilados de la presente invención se refieren a cualesquiera polímeros alcoxilados con propiedades hidrófilas e hidrófobas equilibradas de manera que extraigan las partículas de grasa de los tejidos y las superficies. Realizaciones específicas de los polímeros limpiadores de grasa anfífilicos alcoxilados de la presente invención comprenden una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos alcoxilato unidos a dicha estructura de núcleo.

La estructura de núcleo puede comprender una estructura de polialquilenimina que comprende, en forma condensada, unidades repetitivas de fórmulas (I), (II), (III) y (IV):



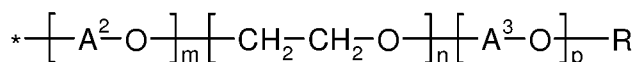
en donde # denota, en cada caso, una mitad de un enlace entre un átomo de nitrógeno y la posición de unión libre de un grupo A¹ de dos unidades repetitivas adyacentes de las fórmulas (I), (II), (III) o (IV); * en cada caso denota una mitad de un enlace a uno de los grupos alcoxilato; y A¹ se selecciona independientemente de entre alquileo C₂-C₆ lineal o ramificado; en donde la estructura de la polialquilenimina consiste en 1 unidad repetitiva de fórmula (I), x unidades repetitivas de fórmula (II), y unidades repetitivas de fórmula (III), y y+1 unidades repetitivas de fórmula (IV), en donde x e y tienen, en cada caso, un valor en el intervalo de 0 a aproximadamente 150; en donde el peso molecular promedio en peso P_m de la estructura de núcleo de polialquilenimina es un valor en el intervalo desde aproximadamente 60 a aproximadamente 10.000 g/mol.

La estructura de núcleo puede comprender alternativamente una estructura de polialcanolaminas de los productos de condensación de al menos un compuesto seleccionado de N-(hidroxialquil)aminas de fórmulas (I.a) y/o (I.b),



en donde A es seleccionado independientemente de entre alquileo de C₁-C₆; R¹, R^{1*}, R², R^{2*}, R³, R^{3*}, R⁴, R^{4*}, R⁵ y R^{5*} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo, en donde los tres últimos radicales mencionados pueden estar opcionalmente sustituidos; y R⁶ se selecciona de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo, en donde los tres últimos radicales mencionados pueden estar opcionalmente sustituidos.

La pluralidad de grupos alquilenoxi unidos a la estructura de núcleo es seleccionada independientemente de entre unidades alquilenoxi de fórmula (V)



(V)

en donde * denota en cada caso, una mitad de un enlace al átomo de nitrógeno de la unidad repetitiva de fórmula (I), (II) o (IV); A² se selecciona, en cada caso, independientemente entre sí, de 1,2-propileno, 1,2-butileno y 1,2-isobutileno; A³ es 1,2-propileno; R se selecciona en cada caso, independientemente entre sí, de hidrógeno y alquilo de C₁-C₄; m tiene un valor promedio en el intervalo de 0 a aproximadamente 2; n tiene un valor promedio en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50; y p tiene un valor promedio en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 50.

Las realizaciones específicas de los polímeros limpiadores de grasa anfífilicos alcoxilados se pueden seleccionar de polialquileniminas alcoxiladas que tienen un bloque interno de poli(óxido de etileno) y un bloque externo de óxido de polipropileno, cuyo grado de etoxilación y el grado de propoxilación no queda por encima o por debajo de los valores limitantes especificados. Las realizaciones específicas de las polialquileniminas alcoxiladas según la presente invención tienen una relación mínima de bloques de polietileno a bloques de polipropileno (n/p) de aproximadamente 0,6, y un máximo de aproximadamente 1,5(x+2y+1)^{1/2}. Se ha descubierto que las polialquileniminas alcoxiladas que tienen una relación n/p de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2(x+2y+1)^{1/2} tienen propiedades especialmente ventajosas.

Las polialquileniminas alcoxiladas según la presente invención tienen una cadena principal que consiste en átomos de nitrógeno correspondientes a aminas primarias, secundarias y terciarias unidos entre sí mediante radicales alquileno A y dispuestos al azar. Los restos amino primarios presentes al comienzo o al final de la cadena principal y de las cadenas laterales de la cadena principal de tipo polialquilenimina y cuyo resto de átomos de hidrógeno son sustituidos posteriormente por unidades alquilenoxi son unidades repetitivas correspondientes a las fórmulas (I) o (IV), respectivamente. Los restos amino secundarios cuyos átomos de hidrógeno restantes son sustituidos posteriormente por unidades alquilenoxi son unidades repetitivas de fórmula (II). Los restos amino terciarios a modo de cadena lateral sobre las cadenas principales corresponden a las unidades repetitivas de fórmula (III).

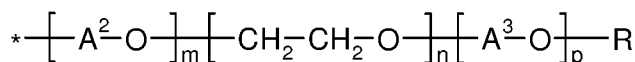
Puesto que la ciclación puede producirse en la formación de la cadena principal de tipo polialquilenimina, también es posible que los restos amino cíclicos estén presentes en pequeña cantidad en la cadena principal. Dichas polialquileniminas que contienen restos amino cíclicos están, por supuesto, alcoxiladas del mismo modo que las que consisten en los restos amino primarios y secundarios no cíclicos.

La cadena principal de tipo polialquilenimina que consiste en los átomos de nitrógeno y en los grupos A¹ tiene un peso molecular promedio, P_m, de aproximadamente 60 a aproximadamente 10.000 g/mol, preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 8.000 g/mol y, más preferiblemente, de aproximadamente 500 a aproximadamente 6.000 g/mol.

La suma (x+2y+1) corresponde al número total de unidades alquilenimina presentes en una cadena principal de tipo polialquilenimina individual y, por lo tanto, está relacionada directamente con el peso molecular de la cadena principal de tipo polialquilenimina. Los valores dados en la memoria descriptiva, sin embargo, se refieren al promedio en número de todas las polialquileniminas presentes en la mezcla. La suma (x+2y+2) corresponde al número total de grupos amino presentes en una cadena principal de tipo polialquilenimina.

Los radicales A¹ que conectan los átomos de nitrógeno amínico pueden ser radicales alquileno C₂-C₆ lineales o ramificados, idénticos o diferentes tales como 1,2-etileno, 1,2-propileno, 1,2-butileno, 1,2-isobutileno, 1,2-pentanodiilo, 1,2-hexanodiilo o hexametileno. Un alquileno ramificado preferido es 1,2-propileno. Son un alquileno lineal preferido el etileno y el hexametileno. Un alquileno más preferido es el 1,2-etileno.

Los átomos de hidrógeno de los grupos amino primarios y secundarios de la cadena principal de tipo polialquilenimina se sustituyen por unidades alquilenoxi de fórmula (V).



(V)

En esta fórmula, las variables preferiblemente tienen uno de los significados indicados a continuación:

A^2 se selecciona, en cada caso, de 1,2-propileno, 1,2-butileno y 1,2-isobutileno; preferiblemente, A^2 es 1,2-propileno. A^3 es 1,2-propileno; R se selecciona, en cada caso, de hidrógeno y alquilo C_1 - C_4 , tal como, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo; preferiblemente, R es hidrógeno. El índice m tiene, en cada caso, un valor de 0 a aproximadamente 2; preferiblemente, m es 0 o aproximadamente 1; más preferiblemente, m es 0. El índice n tiene un valor promedio en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 22 a aproximadamente 40 y, más preferiblemente, en el intervalo de aproximadamente 24 a aproximadamente 30. El índice p tiene un valor promedio en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 11 a aproximadamente 40 y, más preferiblemente, en el intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 30.

Preferiblemente, la unidad alquilenoxi de fórmula (V) es una secuencia no al azar de bloques de tipo alcoxilato. Por secuencia no al azar quiere decirse que el $[-A^2-O-]_m$ se añade primero (es decir, en la posición más cercana al enlace con el átomo de nitrógeno de la unidad repetitiva de fórmula (I), (II), o (III)); el $[-CH_2-CH_2-O-]_n$ se añade en segunda posición, y el $[-A^3-O-]_p$ se añade en tercera posición. Esta orientación proporciona a la polialquilenimina alcoxilada un bloque de poli(óxido de etileno) interior y un bloque de óxido de polipropileno exterior.

La parte sustancial de estas unidades alquilenoxi de fórmula (V) está formada por las unidades etilenoxi $[-CH_2-CH_2-O-]_n$ y las unidades propilenoxi $[-CH_2-CH_2(CH_3)-O-]_p$. Las unidades alquilenoxi pueden tener de forma adicional también una pequeña proporción de unidades propilenoxi o butilenoxi $[-A^2-O-]_m$, es decir, la cadena principal de polialquilenimina saturada con átomos de hidrógeno puede hacerse reaccionar inicialmente con pequeñas cantidades de hasta aproximadamente 2 mol, especialmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 mol, en particular de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 mol, de óxido de propileno u óxido de butileno por mol de restos NH presentes, es decir, incipientemente alcoxiladas.

Esta modificación inicial de la cadena principal de tipo polialquilenimina permite, si es necesario, disminuir la viscosidad de la mezcla de reacción durante la alcoxilación. Sin embargo, la modificación generalmente no afecta las propiedades de rendimiento de la polialquilenimina alcoxilada y de esta forma no constituye una medida preferida.

Los polímeros limpiadores de grasa anfífilos alcoxilados están presentes en las composiciones detergentes y limpiadoras de la presente invención a niveles que varían de aproximadamente 0,05 % a 10 % en peso de la composición. Las realizaciones de las composiciones pueden comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % en peso. Más específicamente, las realizaciones pueden comprender de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 2,5 % del polímero limpiador de grasa.

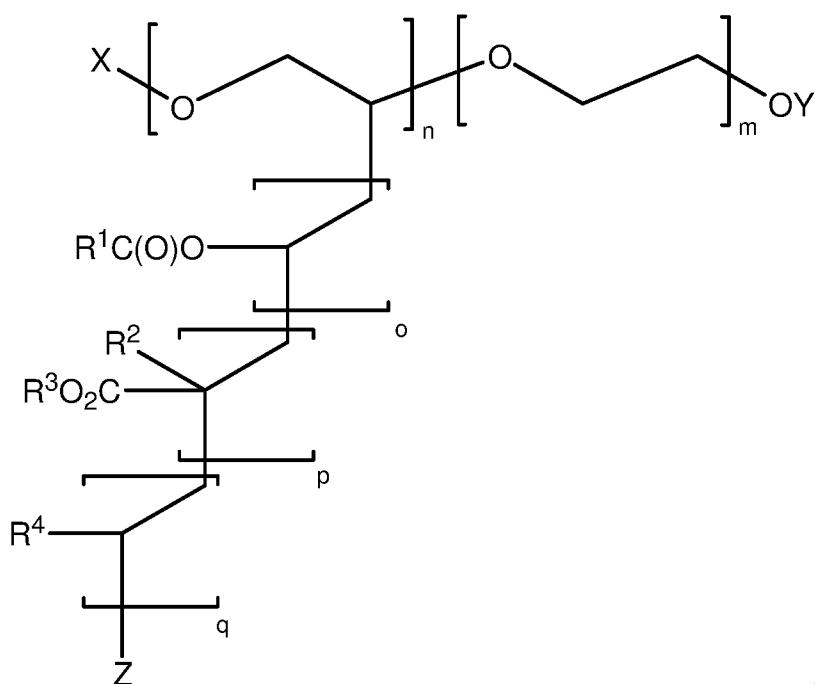
Tensioactivo deteritivo

La composición comprende tensioactivo deteritivo. El tensioactivo deteritivo puede ser aniónico, no iónico, catiónico y/o de ion híbrido. Preferiblemente, el tensioactivo deteritivo es aniónico. Las composiciones preferiblemente comprenden de 2 % a 50 % de tensioactivo, más preferiblemente de 5 % a 30 %, lo más preferiblemente de 7 % a 20 % de tensioactivo deteritivo. La composición puede comprender de 2 % a 6 % de tensioactivo deteritivo. La composición preferiblemente comprende tensioactivo deteritivo en una cantidad para proporcionar de 100 ppm a 5000 ppm de tensioactivo deteritivo en la solución de lavado durante el proceso de lavado. Esto es especialmente preferido cuando se dosifican de 10 g a 125 g de composición detergente para lavado de ropa líquida en la solución de lavado durante el proceso de lavado. La composición en contacto con agua forma típicamente una solución de lavado que comprende de 0,5 g/l a 10 g/l de composición detergente.

Copolímero aleatorio de injerto

Los copolímeros aleatorios de injerto comprenden: (i) cadena principal hidrófila que comprende monómeros seleccionados del grupo que consiste en: ácidos carboxílicos de C_1 - C_6 insaturados, éteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, unidades de azúcar, unidades de alcoxi, anhídrido maleico, polialcoholes saturados tales como glicerol, y mezclas de los mismos; y (ii) cadena(s) lateral(es) hidrófoba(s) seleccionadas del grupo que consiste en: grupo alquilo de C_4 - C_{25} , polipropileno, polibutileno, éster vinílico de un ácido monocarboxílico de C_1 - C_6 saturado, éster alquilico de C_1 - C_6 de ácido acrílico o metacrílico, y mezclas de los mismos.

El polímero preferiblemente tiene la fórmula general:



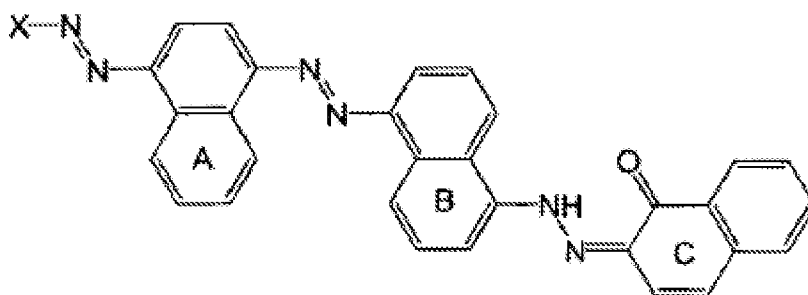
en donde X, Y y Z son unidades de protección terminal seleccionadas independientemente de H o alquilo C₁₋₆; cada R¹ se selecciona, independientemente entre sí, de metil y etilo; cada R² se selecciona, independientemente entre sí, de H y metilo; cada R³ es, independientemente, un alquilo C₁₋₄; y cada R⁴ se selecciona, independientemente entre sí, de grupos pirrolidona y fenilo. El peso molecular promedio en peso (Pm) de la cadena principal de óxido de polietileno tiene típicamente de aproximadamente 1000 g/mol a aproximadamente 18.000 g/mol, o de aproximadamente 3000 g/mol a aproximadamente 13.500 g/mol, o de aproximadamente 4000 g/mol a aproximadamente 9000 g/mol. El valor de m, n, o, p y q se selecciona de forma que los grupos colgantes comprenden, en peso del polímero al menos 50 %, o de aproximadamente 50 % a aproximadamente 98 %, o de aproximadamente 55 % a aproximadamente 95 %, o de aproximadamente 60 % a aproximadamente 90 %. El polímero útil en la presente memoria tiene típicamente un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 1000 a aproximadamente 100.000 g/mol, o preferiblemente de aproximadamente 2500 g/mol a aproximadamente 45.000 g/mol, o de aproximadamente 7500 g/mol a aproximadamente 33.800 g/mol, o de aproximadamente 10.000 g/mol a aproximadamente 22.500 g/mol.

Se han descrito copolímeros de injerto adecuados en mayor detalle en WO07/138054, WO06/108856 y WO06/113314.

Agentes de matizado de tejidos adecuados

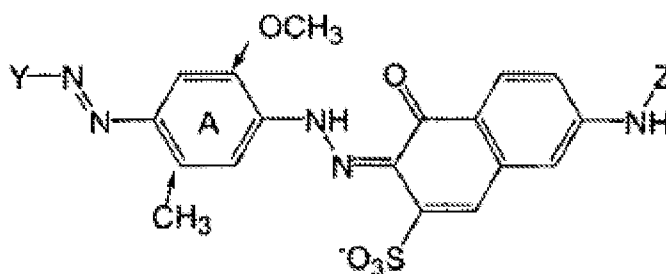
Los abrillantadores ópticos fluorescentes emiten, al menos, algo de luz visible. En cambio, los agentes de matizado de tejidos pueden alterar el tinte de una superficie puesto que absorben, al menos, una porción del espectro de la luz visible. Los agentes de matizado de tejidos adecuados incluyen tintes, conjugados de tinte-arcilla, y pigmentos que satisfacen las necesidades del Método de ensayo 1 en la sección de métodos de ensayo de la presente memoria descriptiva. Los tintes adecuados incluyen los tintes de micromoléculas y los tintes poliméricos. 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



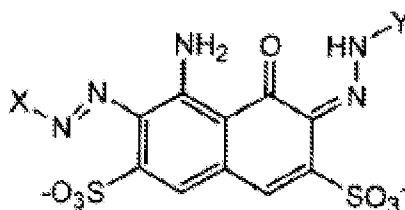
donde al menos dos de los anillos de naftilo A, B y C están sustituidos por un grupo sulfonato, el anillo C puede estar sustituido en la posición 5 por un grupo NH_2 o NHPh , X es un anillo de bencilo o naftilo sustituido con hasta 2 grupos sulfonato y puede estar sustituido en la posición 2 con un grupo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

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



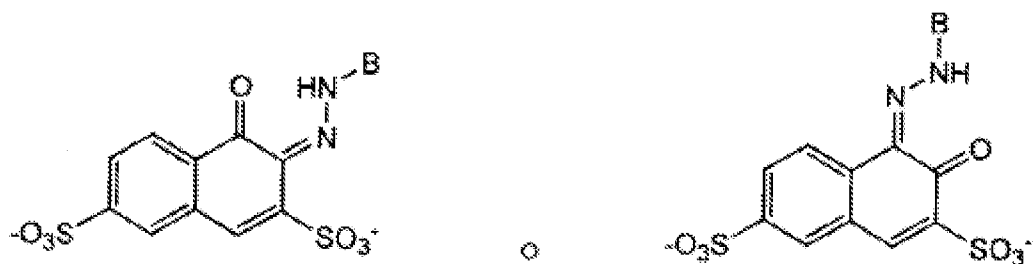
donde Z es H o fenilo, el anillo A está preferiblemente sustituido por un metilo y grupo metoxi en las posiciones indicadas mediante flechas, el anillo A puede también ser un anillo de tipo naftilo, el grupo Y es un anillo bencílico o un anillo naftílico, que está sustituido por un grupo sulfato y puede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

(3) Tintes ácidos azules o rojos de fórmula



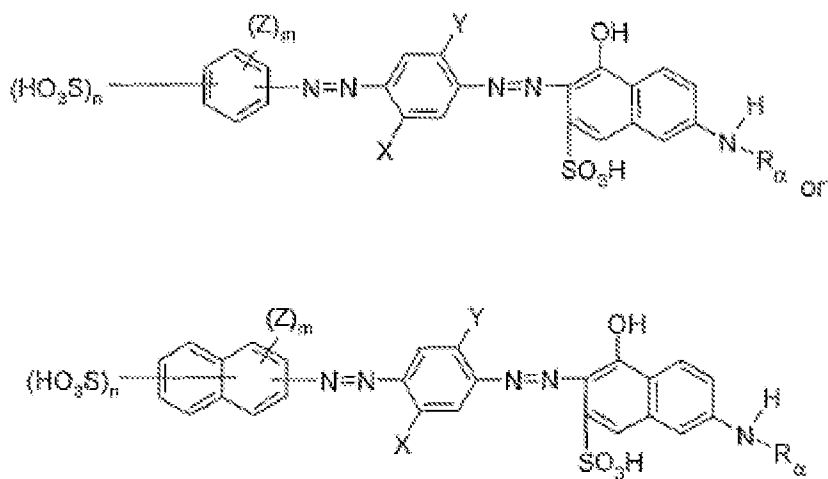
donde X e Y deben ser, al menos uno de los dos, un grupo aromático. En un aspecto, tanto los grupos aromáticos pueden ser un grupo bencilo o naftilo sustituido que puede estar sustituido con grupos no solubles en agua tales como grupos alquilo o alquilo o arilo, X e Y pueden no estar sustituidos con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

(4) Tintes ácidos rojos de la estructura



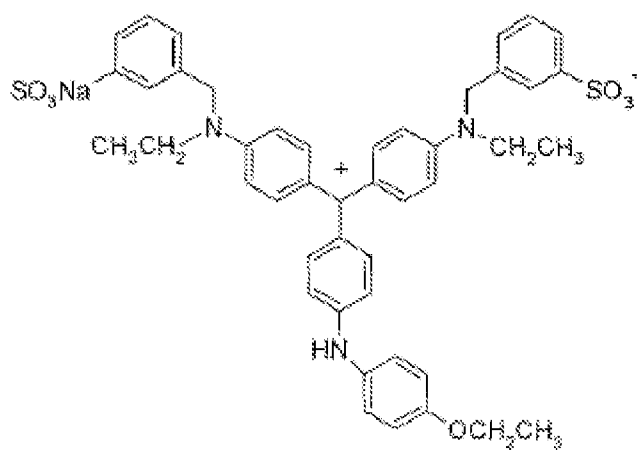
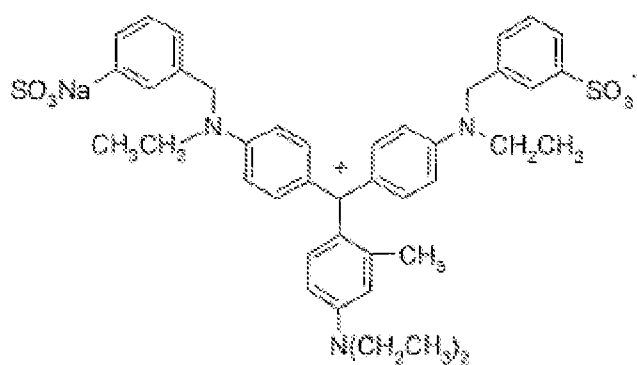
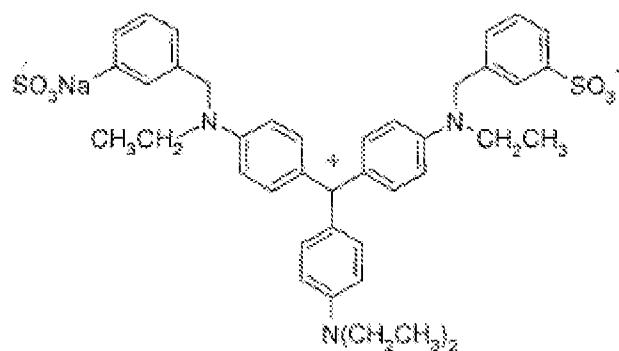
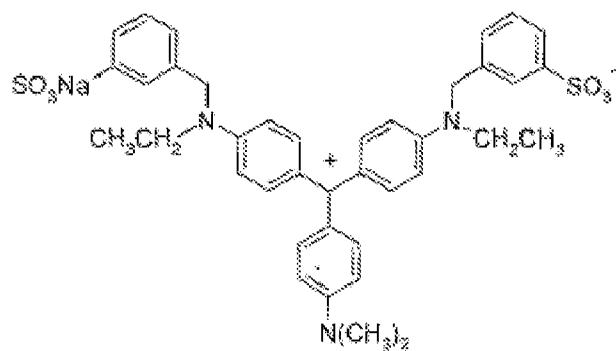
donde B es un grupo naftilo o bencilo que puede estar sustituido con grupos no solubles en agua tales como grupos alquilo o alquilo o arilo, B puede no estar sustituido con grupos solubles en agua tales como sulfonatos o carboxilatos.

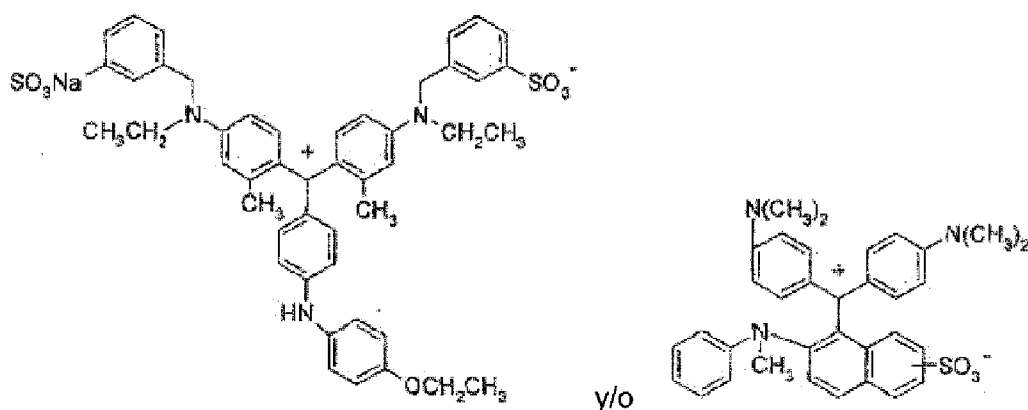
(5) Tintes de tipo dis-azo de la estructura



en 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 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 and 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 tal 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 tipo hectorita, arcilla tipo saponita y mezclas de las mismas. 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 mencionados anteriormente 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.

Ingredientes adyuvantes

Los materiales adyuvantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, agentes quelantes, agentes inhibidores de la transferencia de colorantes, dispersantes, enzimas adicionales, y estabilizadores de enzimas, materiales catalíticos, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos formados previamente, agentes dispersantes poliméricos, agentes antirredépósito/de eliminación de manchas de arcilla, abrillantadores, supresores de las jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastizantes de la estructura, suavizantes textiles, vehículos, hidrótopos, mejoradores del proceso, disolventes y/o pigmentos. Además de la exposición siguiente, los ejemplos adecuados de otros adyuvantes y niveles de uso se encuentran en las patentes US-5.576.282, US-6.306.812 y US-6.326.348.

La presente invención se describe de forma adicional mediante los siguientes ejemplos que no deberían considerarse como limitativos del ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - producción y purificación de variantes de xiloglucanasa

Las variantes de xiloglucanasa de la presente invención se prepararon mediante procedimientos estándar, en resumen: Introduciendo mutaciones aleatorias y/o dirigidas a sitio en el gen, transformando células huésped de *Bacillus subtilis* con los genes mutados, fermentando las células huésped transformadas y obteniendo la variante de xiloglucanasa del caldo de fermentación. La xiloglucanasa de referencia (Id. de sec. n.º: 3) se produjo de forma recombinante en *Bacillus subtilis* de manera similar.

La fermentación se llevó a cabo en cultivos en matraces de agitación a 37 °C durante 4 días, agitando 100 ml de medio PS-1 que contenía una pastilla de CaCO₃ (0,5 g) en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml con regulación de flujo. La composición de medio PS-1 contiene 100 g/l de sacarosa, 40 g/l de harina de soja, 10 g/l de Na₂HPO₄*12H₂O, 0,1 ml/l de Dowfax 63N10 y antibiótico en forma de 6 µg/ml de cloranfenicol.

Después de la fermentación, el caldo de cultivo se recolectó por centrifugación (26.000 x g, 20 min). Un pequeño volumen del sobrenadante se filtró de modo estéril a través de un filtro de 0,45 µm y se almacenó congelado. Se dejó descongelar las muestras inmediatamente antes de comenzar los ensayos de estabilidad descritos a continuación.

En algunos casos, las muestras de enzimas se purificaron antes de utilizarlas en el ensayo de estabilidad.

Para la purificación de enzimas, los sobrenadantes se filtraron a través de una unidad de filtración NALGENE 0,2 µm (n.º de cat. 569-0020) para retirar el resto de las células huésped. El pH del filtrado de 0,2 µm se ajustó a pH 5,0 con CH₃COOH al 20 %, y el filtrado se aplicó a una columna XpressLine ProA (UpFront chromatography A/S) equilibrada en 50 mM de ácido succínico/NaOH, CaCl₂ 1 mM, pH 5,0. Después de lavar la columna XpressLine ProA abundantemente con el tampón de equilibrio, la xiloglucanasa se eluyó mediante una elución en etapas con Tris/HCl 50 mM, pH 9,0. Durante la elución se recogieron fracciones. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad de xiloglucanasa (ejemplo 2) y se agruparon las fracciones con actividad. El pH del grupo se ajustó a pH 9,0 con base de Tris 3M y el conjunto se diluyó con agua desmineralizada hasta una conductividad igual (o inferior) que la de Tris/HCl 50 mM, pH 9,0. La solución ajustada se aplicó a una columna SOURCE Q (GE

Healthcare) equilibrada en Tris/HCl de 50 mM, pH 9,0. Después de lavar la columna SOURCE Q abundantemente con el tampón de equilibrio, la enzima se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 → 0,5 M) en el mismo tampón en cinco volúmenes de columna. Se analizaron nuevamente las fracciones de la columna para determinar la actividad de xiloglucanasa y las fracciones activas se analizaron de forma adicional mediante SDS-PAGE. Las fracciones en las que solo se vio una banda en el gel SDS-PAGE teñido con Coomassie se agruparon como preparación purificada.

Ejemplo 2 - Ensayo de xiloglucanasa

La actividad de xiloglucanasa de las muestras de enzima, p. ej., de purificación, se midió en un ensayo de AZCL-xiloglucano.

El AZCL-xiloglucano (Megazyme) se incubó con la xiloglucanasa y el color azul liberado se midió a 650 nm. La actividad de xiloglucanasa se calculó como el aumento del color azul durante la incubación después de restar el valor del blanco correcto.

Sustrato de AZCL-xiloglucano: 4 mg/ml de AZCL-xiloglucano (Megazyme) suspendido de forma homogénea en Tritón X-100 0,01 % mediante agitación.

Temperatura de ensayo: 37 °C.

Tampón del ensayo: ácido succínico 50 mM/NaOH, Triton X-100 0,01 %, pH 5,0.

Se colocaron 500µl de suspensión de sustrato de AZCL-xiloglucano sobre hielo en un tubo Eppendorf. Se añadieron 500µl de tampón de ensayo y se dejó que la mezcla se enfriara en hielo. Se añadieron 20 µl de muestra de enzima (diluida en Triton X-100 0,01 %). El ensayo se inició transfiriendo el tubo Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que se ajustó a la temperatura del ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a su máxima velocidad de agitación (1.400 rpm). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo. Cuando el tubo se hubo enfriado en hielo, el tubo se centrifugó brevemente en una centrífuga con baño de hielo para precipitar el sustrato que no había reaccionado. Se transfirieron 200 µl de sobrenadante a una placa de microtitulación y se realizó la lectura de A₆₅₀. Se incluyó un blanco de tampón (20 µl de Triton X-100 0,01 % en lugar de enzima) en el ensayo y la diferencia en A₆₅₀ entre muestra de enzima y blanco de tampón fue una medida de la actividad de xiloglucanasa.

Ejemplo 3 - Estabilidad de variantes de xiloglucanasa

La estabilidad en detergente de las variantes de xiloglucanasa de la presente invención se evaluó midiendo la actividad de las variantes después de la incubación en un detergente líquido.

El ensayo de estabilidad se llevó a cabo añadiendo una muestra de enzima al detergente líquido y almacenándolo a temperaturas elevadas, p. ej., de 35 °C o 40 °C. Después del tiempo de almacenamiento prescrito, se determinó la actividad enzimática y se comparó con la actividad de una muestra equivalente almacenada a aproximadamente -18 °C durante el mismo período de tiempo. El resultado del ensayo de estabilidad es la actividad encontrada en la muestra almacenada a temperatura elevada expresada como % de la actividad encontrada en la muestra almacenada en frío.

Los resultados para las variantes de xiloglucanasa se compararon con el resultado correspondiente a la xiloglucanasa progenitora (Id. de sec. n.º 3), sometida a ensayo en las mismas condiciones. La relación entre estos dos resultados de estabilidad es el Stability Improvement Factor (Factor de mejora de estabilidad - SIF).

Las variantes que tienen un SIF>1 son más estables en las condiciones de ensayo que la xiloglucanasa progenitora. Las variantes preferidas son las que tienen un alto valor de SIF en este ensayo.

Detergente

El detergente líquido utilizado para los ensayos de estabilidad tiene la siguiente composición

Alquiletoxisulfato	20,1 %
Sulfonato de alquilbenceno	2,7 %
Alquilsulfato	6,5 %
Alquiletoxilato	0,8 %
Ácido cítrico	3,8 %
Ácido graso	2,0 %
Bórax	3,0 %
Na & formiato de Ca	0,2 %

ES 3 023 360 T3

	Polímeros etoxilados de amina	3,4 %
	Ácido dietilentriaminopentaacético	0,4 %
	Tinopal AMS-GX	0,2 %
5	Etanol	2,6 %
	Propilenglicol	4,6 %
	Dietilenglicol	3,0 %
	Polietilenglicol	0,2 %
10	Monoetanolamina	2,7 %
	NaOH	Hasta pH 8,3
	Componentes minoritarios (proteasa, amilasa, perfume, tinte)	2,3 %
15	Agua	Resto

Ensayo de almacenamiento

20 Las muestras de enzimas preparadas según el ejemplo 1 se dejaron descongelar inmediatamente antes de comenzar el ensayo de estabilidad de almacenamiento.

Las muestras de enzimas se diluyeron a una concentración de aproximadamente 0,25 mg de proteína enzimática por ml.

25 El detergente líquido se introdujo en frascos de vidrio con un volumen de aproximadamente 12 ml, proporcionando $1,0 \pm 0,05$ gramos de detergente en cada vidrio.

30 Para cada muestra de enzima se prepararon dos frascos por duplicado. Se añadieron 50 µl de enzima diluida y se añadió una pequeña barra agitadora magnética a los frascos y se cerraron herméticamente (para evitar la evaporación durante el almacenamiento). El contenido se mezcló con ayuda de la barra agitadora magnética durante aproximadamente 5 minutos. Un frasco del par se colocó en un congelador a aproximadamente -18 °C. El otro frasco se colocó en un horno incubador adecuado a la temperatura elevada prescrita, p. ej., 35 °C o 40 °C, para someterlo a ensayo. Después del tiempo de almacenamiento prescrito, los frascos del horno incubador se transfieren al congelador.

Ensayo de actividad

40 La actividad de las muestras de enzimas después del almacenamiento en detergente se midió utilizando el siguiente procedimiento.

Materiales y reactivos:

45 Tampón Fosfato 1M, pH7:

Se disuelven 138 gramos de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en aproximadamente 750 ml de agua. Se añade NaOH 4N para obtener un pH de 7,0.

50 A continuación se obtiene el volumen final a 1.000 ml.

Tampón de ensayo (fosfato 50 mM, pH 7):

55 Se mezclan 950 ml de agua, 50 ml de tampón fosfato 1M pH7 y 5 ml de Berol 537 (tensioactivo no iónico suministrado por Akzo Nobel). Se ajusta el pH final a $7,00 \pm 0,02$.

Sustrato:

60 Pastillas de Cellazyme C, suministradas por Megazyme International Ireland Ltd, número de catálogo T-CCZ. Las pastillas contienen celulosa HE teñida y reticulada.

Procedimiento

65 Aproximadamente 30 minutos antes de iniciar el ensayo los frascos se transfieren desde el congelador a un refrigerador a aproximadamente 4 °C. Inmediatamente antes de comenzar el ensayo, los frascos se sacaron del refrigerador y se colocaron sobre la mesa de laboratorio y se abrieron.

Se añadieron 10 ml de tampón de ensayo (temperatura ambiente) a cada frasco abierto. Los frascos se transfirieron a continuación a un baño de agua a 30 °C equipado con un agitador magnético multipunto sumergido. Los contenidos se agitaron suavemente durante aproximadamente 5 minutos.

5 Se añadió una pastilla de Cellazyme C a cada frasco. Se continuó agitando utilizando una velocidad de agitación justamente adecuada para mantener las partículas del sustrato en movimiento y evitar la sedimentación. Los frascos se retiraron del baño de agua 30 minutos después de la adición de la pastilla y a continuación se dejaron reposar a temperatura ambiente sin agitación durante 15 minutos.

10 Con una pipeta, se transfirió aproximadamente 1 ml del sobrenadante prácticamente incoloro de la parte superior de cada frasco a una cubeta de espectrofotómetro de semi-microanálisis. A continuación se midió la absorbancia a 590 nm utilizando un espectrofotómetro adecuado. Todas las mediciones se finalizaron en el transcurso de 15 minutos.

15 En el ensayo se incluyeron muestras en blanco, es decir, muestras de detergente equivalentes, pero que no contenían enzima xiloglucanasa añadida.

Cálculo

Para cada muestra de enzima hay dos mediciones Abs590:

- 20 ▪ A590f, que es el valor de Abs590 de la muestra almacenada a -18 °C
- A590w, que es el valor de Abs590 de la muestra almacenada a temperatura elevada.

25 Se resta el valor correspondiente al blanco (A590b) tanto de A590f (obteniéndose A590f - A590b) como de A590w (obteniéndose A590w - A590b).

La estabilidad se calculó como:

30
$$\% \text{ de estabilidad} = ((A590w - A590b) / (A590f - A590b)) \times 100 \%$$

Para cada enzima los resultados para (A590f - A590b) deben estar en el intervalo de 0,1 - 1,2. Si el valor está fuera de este intervalo, el resultado de esa enzima debe considerarse no fiable y el ensayo debe repetirse con una dilución diferente de la muestra de enzima.

35 Finalmente, se calcula el Stability Improvement Factor (Factor de mejora de la estabilidad - SIF) para cada variante de enzima del siguiente modo:

40
$$\text{SIF} = \% \text{ de estabilidad de muestra de enzima} / \% \text{ estabilidad de enzima precursora (ld. de sec. n.º: 3)}$$

Resultados

A continuación se muestran los resultados de estabilidad de variantes de xiloglucanasa (algunas según la invención, otras comparativas) en diferentes condiciones de ensayo.

45 **Tabla 1:** Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 18 horas a 40 °C.

Mutaciones	SIF
K8Q	1,1
K8A	1,2
K13A	1,1
K18R	1,1
K87Q	1,1
K129A	1,7
K169Q	1,3
K169R	1,4
K169A	1,3
N140F	1,2
G316I	1,1
F418I	1,1
L34I	1,1
L166I	1,1

Mutaciones	SIF
L268I	1,1
L278I	1,3
V1*+ V2*+H3*	1,2
*0aE+*0bV	1,3
F146L	1,2
Q137E	1,6
R156Y	2,2
R156Q	1,5
K8S	1,2
K21T	1,4
K176P	1,1
K445S	1,4
K470T	1,2

Tabla 2: Muestras de enzimas purificadas almacenadas durante 18 horas a 40 °C.

Mutaciones	SIF
K87Q	1,1
K129A	1,8
K169A	1,1
A7T+G200P+A224P+G225K+R267K+L268K+S269A	1,3
H164N+V179I+G200A+R267K	1,2
H164N+V179I+G200A+R211K+G225D+F281L	1,5
H164N+G200A+G225N+R267K	1,2

Tabla 3: Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 24 horas a 40 °C.

Mutaciones	SIF
K101R+L102I	1,1
K217A	1,1
L380F	1,1
N383Y	1,2
G78A	1,2
M310V	1,2
N399I	1,1
G498S	1,1
F146L	1,1
Q137E	1,4
R156Y	2,0
V1*+ V2*+H3*+G4*+Q5*	1,1
N331F	1,2
K8S	1,1
T92V	1,3
K176P	1,2
G253A	1,1
K445S	1,3
K470T	1,2

Tabla 4: Muestras de enzimas purificadas almacenadas durante 24 horas a 40 °C.

Mutaciones	SIF
T92V	1,2

Mutaciones	SIF
Q137E	1,5
R156Y	1,7
R156Q	1,2

Tabla 5: Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 30 horas a 40 °C.

Mutaciones	SIF
K118R	1,1
K118A	1,7
K129A+K169A	1,6
G200P	1,5
K129A+R156Y	2,0
K129A+Q137E+R156Y	2,2
K129A+R156Y+H164N	2,1

Tabla 6: Muestras de enzimas purificadas almacenadas durante 30 horas a 40 °C.

Mutaciones	SIF
T92V	1,3
R156Y	1,9
K129A+R156Y	2,1

Tabla 7: Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 48 horas a 40 °C.

Mutaciones	SIF
K118A	3,0
K252Q	1,1
K252R	1,2
K252A	1,1
K275Q	1,1
K275R	1,2
K275A	1,1
K306R	1,1
K306A	1,1
K347Q	1,1
K347R	1,1
K347A	1,1
K382A	1,1
K414A	1,2
K445R	1,3
K454R	1,1
K476Q	1,1
K482Q	1,1
K482A	1,1
K488Q	1,1
K488R	1,1
K488A	1,1
M40V	1,4
R156Y	2,9
G200P	1,8
K129A+R156Y	3,5
K129A+Q137E+R156Y+K470T	3,7
K406N	1,1
K445S	1,2

ES 3 023 360 T3

	Mutaciones	SIF
	K488T	1,2
5	T92V+K129A+R156Y	3,7
	K118A+K129A+R156Y	3,8
	T92V+K118A+K129A+R156Y	3,9
	K129A+R156Y+P507A	3,2
	K129A+R156Y+S443D+K445S+L449I+V450I+S455N+M456Y	3,8
10	K129A+R156Y+H436Y	3,9
	K129A+R156Y+K406N+N415G	3,5
	K129A+R156Y+L380F+N383Y+D384G+N389T	3,5
	K129A+R156Y+D366H+T374A	3,4
15	K129A+R156Y+A328G	3,5
	K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A	3,5
	K129A+R156Y+T244D	3,4
	K129A+R156Y+I222V+A224P+V228I+V232A	2,0
20	K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	3,6
	K129A+R156Y+A177T+V179I+A183S	2,9
	K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y	2,8
	K129A+R156Y+I10V+V14I+D19E	4,0
25	T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y	2,1
	S123T+K129A+R156Y	3,8
	K129A+Q137E+V139K+N140F+Q147S+R156Y	2,9
	K129A+R156Y+D324N	3,4
30	K129A+R156Y+K176P	3,2
	K129A+R156Y+D249N	3,2
	K129A+R156Y+D249G	3,3
	K129A+R156Y+D249S	3,1
	K129A+R156Y+D461N	3,6
35	K129A+R156Y+D461T	3,9
	K129A+R156Y+D461Q	4,0
	K129A+R156Y+R409T	3,8
	K129A+R156Y+R409L	3,6
40	K129A+R156Y+D247G	1,4
	K129A+R156Y+E288Q	2,7
	D37G+K129A+R156Y	3,9
	D37N+K129A+R156Y	3,6
45	K129A+R156Y+R267H	3,8
	K129A+R156Y+D303I	4,1
	K129A+R156Y+D303K	3,7
	K129A+R156Y+K275T	3,5
50	K129A+R156Y+G200P	3,9
	K129A+R156Y+N331F	3,8
	R156Y+N331F	3,2
	K118A+K129A+R156Y+K470T	4,4
55	K470R	1,1
	K470P	1,2
	G413A	1,1
	K118A+K129A+R156Y+A224P	3,9
60	D119L	1,3
	K87V+K129A+K169A	1,9
	K129A+K445S	1,8
	K118A+K129A+R156Y+G200P	3,8
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,2
65	G78A+K118A+K129A+R156Y	3,8

ES 3 023 360 T3

	Mutaciones	SIF
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	3,8
	T92V+K118A+K129A+R156Y	3,7
5	M310V+N399I	1,7
	L34I+K129A	1,9
	K101A+K129A	1,8
	K13A+K129A	2,0
10	K129A+K470T	1,8
	K129A+K176P	1,9
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	4,8
	K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	4,7
15	K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	4,7
	K129A+R156Y+K454Q	3,8
	G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,2
	T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,3
20	K129A+R156Y+N302K+D303S	2,9
	K129A+R156Y+N302K+D303L	2,7
	S332P+V397I	1,1
	K129A+R156Y+K322I+K454Q	2,3
25	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,1
	Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5,2
	Q68H+T92A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,7
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5,0
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5,7
30	Q68H+T92D+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	3,3
	Q68H+T92I+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,4
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,4
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,2
35	K129S	1,1
	K129A	1,5
	R156M	1,3
	R156F	2,3
40	R156W	1,6
	R156L	1,4
	R156V	2,2
	G396P	1,3
45	G413S	1,1
	A177T	1,1
	E38I	1,1
	E38V	1,2
50	G36V+D37A+E38*+N39*	1,2
	T104A	1,2
	L102A+T104V+*104P	1,3
	Q68L	1,3
55	Q68H	3,6
	N389A	1,1
	G468Y	1,1
	G237V	1,1

60 **Tabla 8:** Muestras de enzimas purificadas almacenadas durante 48 horas a 40 °C.

	Mutaciones	SIF
	K118A	2,3
65	R156Y	2,5
	K129A+K169A	1,7

	Mutaciones	SIF
	G200P	1,5
	K129A+R156Y	1,7
5	K129A+Q137E+R156Y	3,7
	K129A+R156Y+H164N	3,5
	K129A+Q137E+R156Y+K470T	4,2
	T92V+K129A+R156Y	4,5
10	K118A+K129A+R156Y	3,8
	K129A+R156Y+G200P	4,8
	K129A+R156Y+N331F	4,1
	R156Y+N331F	3,5
15	K118A+K129A+R156Y+G200P,	4,2
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,5
	G78A+K118A+K129A+R156Y	4,0
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	4,3
20	Q68H	3,7

Tabla 9: Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 72 horas a 40 °C.

	Mutaciones	SIF
25	K13R	1,3
	K206Q	1,1
	K129A+R156Y	5,1
	K129A+Q137E+R156Y+K470T	6,4
30	T92V+K129A+R156Y	6,6
	K118A+K129A+R156Y	7,2
	K129A+R156Y+G200P	7,7
	K129A+R156Y+N331F	5,9
35	R156Y+N331F	5,3

Tabla 10: Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante una semana a 35 °C.

	Mutaciones	SIF
40	K8Q	1,4
	K8A	1,1
	K13Q	1,1
45	K18Q	1,1
	K18A	1,4
	K21Q	1,4
	K21R	1,4
50	K21A	1,4
	K87Q	1,3
	K101R	1,3
	K101A	1,6
55	K118R	1,4
	K118A	2,3
	K101R+L102I	1,1
	K129A	2,1
60	K169Q	1,4
	K169R	1,5
	K169A	1,5
	K220Q	1,3
65	K220A	1,2

ES 3 023 360 T3

	Mutaciones	SIF
	K252Q	1,1
	K252R	1,1
5	K275Q	1,1
	K275R	1,1
	K275A	1,1
	K306R	1,1
10	K306A	1,1
	K307Q	1,2
	K307R	1,1
	K454Q	1,6
15	K454R	1,2
	K476Q	1,3
	K476R	1,3
	K476A	1,2
20	K482Q	1,2
	K482A	1,2
	K488Q	1,2
	K488R	1,2
25	K488A	1,1
	N140F	1,7
	G78A	1,2
	M310V	1,3
30	G316I	1,1
	W391V	1,1
	N399I	1,4
35	L34I	1,3
	L268I	1,1
	L278I	1,2
	G498S	1,2
40	*0aE+*0bV	1,4
	F146L	2,3
	Q137E	2,0
	R156Y	3,2
45	R156Q	1,7
	N331F	1,5
	K8S	1,3
	K21T	1,5
50	K176P	1,2
	G253A	1,1
	K445S	1,5
	K470T	1,6
55	F146C	1,3
	K129A+K169A	1,8
	G200P	1,7
	A224P	1,1
60	K129A+R156Y	2,6
	K129A+Q137E+R156Y	2,6
	K129A+R156Y+H164N	2,6
	K406N	1,3
65	K445S	1,2

Mutaciones	SIF
K488T	1,2
K129R	1,1
R156F	2,0

Tabla 11: Muestras de enzimas filtradas almacenadas en condiciones estériles durante una semana a 35 °C.

Mutaciones	SIF
K101R	1,1
K101A	1,1
K118A	2,3
K129A	1,8
K169R	1,2
K169A	1,1
T92V	2,0
F418I	1,1
del(V1-Q5)	1,2
Q137E	1,6
R156Y	2,5
R156Q	1,2
K21T	1,1
G200P	1,7
K129A+R156Y	2,7
K129A+Q137E+R156Y	3,0
K129A+R156Y+H164N	3,1
A7T+G200P+A224P+G225K+R267K+L268K+S269A	1,3
H164N+V179I+G200A+R267K	1,3
H164N+V179I+G200A+R211K+G225D+F281L	1,8
H164N+G200A+G225N+R267K	1,6

Tabla 12: Muestras de enzimas purificadas almacenadas durante 16 horas a 44 °C.

Mutación	SIF
Q68H	5,8
S123P	4,4
R156Y	4,0
K118A	2,9
G200P	2,6
K129A	2,4
Q137E	2,4
H193T	2,1
T92V	2,0
S76W	1,7

Ejemplo 4 - Estabilidad de variantes de xiloglucanasa

La estabilidad en detergente de las variantes de xiloglucanasa del presente ejemplo (algunas según la invención, otras comparativas) se evaluó midiendo la actividad de las variantes después de la incubación en un detergente líquido.

El ensayo de estabilidad se llevó a cabo añadiendo una muestra de enzima al detergente líquido y almacenándolo a temperaturas elevadas, p. ej., de 35 °C o 46 °C. Después del tiempo de almacenamiento prescrito, se determinó la actividad enzimática y se comparó con la actividad de una muestra equivalente almacenada en frío a aproximadamente +5 °C durante el mismo período de tiempo. El resultado del ensayo de estabilidad es la actividad obtenida para la muestra almacenada a temperatura elevada (la muestra estresada) expresada como % de la actividad encontrada en la muestra almacenada en frío equivalente (la muestra no estresada).

ES 3 023 360 T3

Los resultados para las variantes de xiloglucanasa se compararon con el resultado correspondiente a la xiloglucanasa progenitora (Id. de sec. n.º 3), sometida a ensayo en las mismas condiciones.

5 Detergente

El detergente líquido utilizado para los ensayos de estabilidad tiene la siguiente composición

10	Alquiletoxissulfato	20,1 %
	Sulfonato de alquilbenceno	2,7 %
	Alquilsulfato	6,5 %
	Alquiletoxilato	0,8 %
15	Ácido cítrico	3,8 %
	Ácido graso	2,0 %
	Bórax	3,0 %
	Na & formiato de Ca	0,2 %
	Polímeros etoxilados de amina	3,4 %
20	Ácido dietilentriaminopentaacético	0,4 %
	Tinopal AMS-GX	0,2 %
	Etanol	2,6 %
	Propilenglicol	4,6 %
25	Dietilenglicol	3,0 %
	Polietilenglicol	0,2 %
	Monoetanolamina	2,7 %
	NaOH	hasta pH 8,3
30	Componentes minoritarios (proteasa, amilasa, perfume, tinte)	2,3 %
	Agua	Resto

Ensayo de almacenamiento

35 Las muestras de enzimas preparadas según el ejemplo 1 se dejaron descongelar inmediatamente antes de comenzar el ensayo de estabilidad de almacenamiento.

Las muestras de enzimas se utilizaron sin dilución adicional.

40 El detergente líquido se introdujo en una placa de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno de fondo redondo (placa 1) proporcionando 190 µl de detergente por pocillo.

45 Se añadieron diez µl de muestra de enzima y una pequeña varilla agitadora magnética a cada pocillo y la placa se cerró herméticamente (para evitar la evaporación) utilizando tapas de lámina de aluminio adhesiva (Beckman Coulter). El contenido se mezcló con ayuda de la barra agitadora magnética durante aproximadamente 30 minutos.

De cada pocillo de la placa 1, se transfirieron a continuación 20 µl de mezcla de enzimas detergentes a una nueva placa idéntica vacía (placa 2). A continuación, se sellaron ambas placas.

50 El frasco original (placa 1) se colocó en un horno incubador a la temperatura elevada prescrita, p. ej., de 35 °C o 46 °C, para someterlo a ensayo. La otra placa (placa 2) se colocó en un refrigerador a aproximadamente 5 °C.

55 Después de la incubación durante el período establecido, las placas se retiraron del refrigerador y del horno incubador. Las placas se colocaron en la mesa de laboratorio durante al menos media hora para permitir que todos los pocillos alcanzaran la temperatura ambiente.

A continuación, se transfirieron 20 µl de cada pocillo de la placa 1 a una nueva placa de 96 pocillos de fondo redondo vacía (placa 1a).

60 La placa 1a contiene ahora muestras estresadas de 20 µl y la placa 2 contiene muestras no estresadas de 20 µl.

Ensayo de actividad

65 La actividad de las muestras de enzima después del almacenamiento en detergente se midió utilizando el siguiente procedimiento a temperatura ambiente.

Principio de ensayo:

El para-nitrofenol-beta-D-celotetraósido (pNP-beta-D-celotetraósido) es un sustrato sintético que se hidroliza mediante la acción catalítica de determinadas enzimas xiloglucanasa.

El sustrato en sí es incoloro; sin embargo, tras la hidrólisis del enlace glucosídico de extremo reductor terminal, se libera para-nitrofenol, que es amarillo en un tampón de pH 8 debido a su fuerte absorbancia a 405 nm.

El pNP-beta-D-celotetraósido en sí es muy estable en las condiciones de ensayo dadas. Por lo tanto, el aumento de la absorbancia a 405 nm es una propiedad de la actividad enzimática.

Descubrimos que la xiloglucanasa progenitora (Id. de sec. n.º: 3) aceptaba pNP-beta-D-celotetraósido como sustrato, como puso de manifiesto el fuerte aumento de la absorbancia a 405 nm.

Materiales y reactivos:

Tampón del ensayo: EPPS 100 mM; Tween 20 0,01 %; pH 8,0.

pNP-beta-D-celotetraósido (n.º CAS: 129411:-62-7; Toronto Research Chemicals; Canadá)

Solución de sustrato: pNP-beta-D-celotetraósido 1 mM en tampón de ensayo.

Procedimiento:

La placa 1a contiene muestras estresadas de 20 µl y la placa 2 contiene muestras no estresadas de 20 µl.

Las muestras se diluyeron añadiendo 50 µl de tampón de ensayo a todos los pocillos de la placa 1a y la placa 2, y se mezclaron durante una hora utilizando un agitador de placa de microtitulación. A continuación se añadieron 50 µl de tampón de ensayo adicionales a todos los pocillos y se continuó la agitación durante 10 minutos más.

Se transfirieron 20 µl de las muestras diluidas con factor 6 a una placa de microtitulación de poliestireno transparente de 384 pocillos, y se añadieron 20 µl de solución de sustrato a todos los pocillos. Las muestras se mezclaron agitando la placa de microtitulación brevemente. La medición cinética de la actividad enzimática se inició inmediatamente observando la velocidad de aumento de la absorbancia a 405 nm utilizando un lector espectrofotométrico de 384 pocillos.

Se determinó la velocidad inicial (abs/min) de la reacción. La velocidad inicial de la reacción fue una medida de la actividad enzimática en la muestra, según se verificó mediante una curva estándar lineal dentro de concentraciones de enzima relevantes.

Cálculo:

el % de actividad residual se calculó como la actividad enzimática en la muestra estresada dividida por la actividad enzimática en la muestra idéntica no estresada.

$$\% \text{ actividad residual} = \frac{\text{Abs/min (muestra estresada)}}{\text{Abs/min (muestra no estresada)}} \times 100 \%$$

Resultados

A continuación se muestran los resultados de estabilidad de variantes de xiloglucanasa (algunas según la invención, otras comparativas) en diferentes condiciones de ensayo.

Tabla 13. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	7
K118A	24
R156Y	36
K129A+K169A	19
G200P	26
K129A+R156Y	51
K129A+Q137E+R156Y	72

Mutaciones	% Actividad residual
K129A+R156Y+H164N	63

Tabla 14. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +47 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	77
Q68H+T92A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	83
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	91
Q68H+T92D+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	49
Q68H+T92Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	78
Q68H+T92I+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	89
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	95
Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F	67
Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	81
Q68H	52
K118A+K129A+R156Y	52
T92V+K118A+K129A+R156Y	88
K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	68
S123T+K129A+R156Y	65
K129A+R156Y+G200P	73
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	90
G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	98
T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	95

Tabla 15. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	22
R156Y	59
K13R	34
K307Q	31
K414A	34
G253A	33
G498S	31
M310V	38
N399I	30
V1*+ V2*+H3*+G4*+Q5*	31
F146L	34
K445S	30
K470T	30

Tabla 16. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +45 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	6
R156Y	34
K129A+R156Y	55
K101R+L102I	12
K118A+K129A+R156Y	72
K129A+R156Y+P507A	57
K129A+R156Y+D366H+T374A	44

Mutaciones	% Actividad residual
K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A	40
K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	49
K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y	30
T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y	39
S123T+K129A+R156Y	70
K129A+R156Y+D324N	60
K129A+R156Y+D461N	59
K129A+R156Y+D461T	61
K129A+R156Y+D461Q	59
D37G+K129A+R156Y	60
D37N+K129A+R156Y	64
K129A+R156Y+R267H	64
K129A+R156Y+D303I	62
K129A+R156Y+D303K	65
K129A+R156Y+K275T	68
K129A+R156Y+G200P	92
K118A+K129A+R156Y+K470T	80
H164N	<5
K129A+R156Y+N302K+D303S	66
K129A+R156Y+N302K+D303L	64

Tabla 17. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	26
R156Y	58
K118A+R156Y+G200P	84
K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	92
K445C+K470C	32
F281L	32
D366H	35
K392G	26
D395G	35
S76W	47
G498D	32
G498A	36
D324N	39
S123T	36
Q68Y	6
Q68C	13
K129A+R156Y	89
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	100

Tabla 18. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	34
R156Y	66
R156M	39
R156F	63
R156W	44

Mutaciones	% Actividad residual
R156L	34
R156P	<5
R156V	50
R156T	35
R156S	27
R156A	36
R156D	34
R156K	52
R156N	29
R156I	50
T92I	39
R156Q	34

Tabla 19. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	25
R156Y	70
R156E	66
R156F	65
T92V	43
R156P	<5
R156V	53
R156K	38
R156I	31

Tabla 20. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	31
R156Y	65
N415S	34
S443E	33
S443K	32
S443Q	35
K129T	46
K129A	50
G468Y	32
G237A	34
G237S	34
G237V	25
G468S	32

Tabla 21. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	21
R156Y	45
S332P	41
K129A+R156Y+K176S	73
K129A+R156Y+D303V	77
K129A+R156Y+D303S	81

	Mutaciones	% Actividad residual
	R197L	20
	R340N	41
5	R340T	43
	H193S	51
	H193D	49
	H193T	66
10	L34F	43
	Q137D	24
	Q149E	48
	T9D	40
15	A83E	49
	S214E	25
	K129A+R156Y	98
20	T92V	49
	T92I	36

Tabla 22. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +47 °C.

	Mutaciones	% Actividad residual
25	Id. de sec. n.º: 3	<5
	R156Y	29
	Q68H+R156V+G200P+N331F	93
30	Q68H+R156F+G200P+N331F	Aprox. 100
	Q68H+G200P+N331F	Aprox. 100
	Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	86
	Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	86
35	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	91
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	82
	Q68H+T92V+G200P+M310V	82
	Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V+N331F	Aprox. 100
40	Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F	Aprox. 100
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	86
	Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	80
	D366H	<5
45	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	81
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	87
	Q68H T92V K118A K129A R156Y G200P N331F	80
50	M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+N153K+ H164N+D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+N415S+T421I+ S424N+N441D+V450I+E489A+A490V+T517A+S522*	41
55	I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+ T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+V272A+I337L+M356L+T374A+V397A+S416 A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+ A469E+K470T+I473G+T517A+S522P+P523V+V524E	52
	Q32H+M40L+R49G+D65E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+92A+L102Q+T104A+Q137 E+H164N+K202E+I222V+V228I+D249N+ M356L+T374A	41
60	I10V+F17S+Y53H+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+T172V+A17 7T+I222V+V228I+D249N+S269N+I337L+ M356LV397A+S416A+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+ K470T+I473G+T517A+S522*	26

Tabla 23. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 64 horas a +46 °C.

Mutaciones		% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3		<5
R156Y		<5
5	Q68H+R156V+G200P+N331F	80
	Q68H+R156F+G200P+N331F	84
	Q68H+G200P+N331F	63
	Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	52
10	Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	67
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	63
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	68
	Q68H+T92V+G200P+M310V	48
15	Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V+N331F	93
	Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F	100
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	91
	Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	80
20	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	56
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	86
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	88

Tabla 24. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones		% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3		16
30	R156Y	52
	T374A	27
	F146L+K322I	24
	K129A+Q137E+R156Y+G200P	87
35	Q68S	14
	Q68T	<5
	K129A+R156Y	71
	F146L	26
40	K129A+R156Y+G200P	82
	Q68H	77

Tabla 25. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones		% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3		19
R156Y		53
50	K101A+K129A	47
	K129A+K470T	46
	S332P	29
	G413A	30
55	K118A+K129A+R156Y+A224P	81
	K129A+K176P	50
	K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	89
	K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	86
60	K129A+R156Y+K454Q	86
	K13A+K129A	49
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	93
	K129A+R156Y+K322I+K454Q	76
65	K129A	47

Mutaciones	% Actividad residual
K129A+R156Y	74
K118A+K129A+R156Y	77
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	Aprox. 100
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	93

Tabla 26. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 6 días a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	<5
Q68H+R156V+G200P+N331F	50
Q68H+R156Y+G200P+N331F	60
Q68H+R156F+G200P+N331F	64
Q68H+G200P+N331F	40
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	32
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	42
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	43
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	34
Q68H+T92V+G200P+M310V	27
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	93
Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	58
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	27
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	75
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	70

Tabla 27. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 64 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	9
K101A+K129A	6
K129A+K470T	4
S332P	<5
G413A	<5
K118A+K129A+R156Y+A224P	51
K129A+K176P	6
K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	67
K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	63
K129A+R156Y+K454Q	52
K13A+K129A	5
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	72
K129A	5
K129A+R156Y	32
K118A+K129A+R156Y	30
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	63
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	72

Tabla 28. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 64 horas a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	4

Mutaciones	% Actividad residual
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	71
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I	59
K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F	62
T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	74
T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F	70
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	87
Q68H+T92V+K118A+S123T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+ N331F	90
T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	66
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	68
Q68H T92V K118A K129A R156Y G200P N331F	83

Tabla 29. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	19
R156Y	51
S123P	69
V159M	21
V345I	34
G225S	30
V232A	<10

Tabla 30. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 10 días a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	<5
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	32
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I	16
K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F	23
T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	34
T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F	31
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	67
Q68H+T92V+K118A+S123T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+ N331F	81
T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	23
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	25
Q68H T92V K118A K129A R156Y G200P N331F	61

Tabla 31. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	15
R156Y	51
Q68F	<5
Q68N	69
Q68Y	<5
Q68D	<10
Q68C	<10
Q68G	<10
Q68S	<10
Q68E	<5
Q68A	<5

Mutaciones	% Actividad residual
Q68M	27
Q68W	<10
Q68H	82

Tabla 32. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 7 días a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	<5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F	81
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	74
Q68H+T92V+Q137E+R156Y+G200P+N331F	80
Q68H+T92V+K118A+Q137E+G200P+N331F	65
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	80
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	67
G78A+K118A+K129A+R156Y+K169A	14
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	73
K129A+R156Y	<5
G78A+K118A+K129A+R156Y	7

Tabla 33. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 48 horas a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	9
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	67
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	79
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	85
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	73
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	72
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	78
Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	78
Q68H+R156Y+H193T+D366H	68
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	67
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	80
Q68H+T92V+R156Y+H193T	84
Q68H+T92V+R156F+H193T	66
Q68H+R156Y+H193T	66
Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	93
Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	82
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K	76
Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	73
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	89
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	95
Q68H+K129A+R156K+G200P+N331F	86
Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F	81
Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F	68

Tabla 34. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	22

Mutaciones	% Actividad residual
R156Y	61
S123T+K129A+R156Y	83
H193T	44
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	91
S123T	55
S123P	73
V232A	<10
K129A+R156Y	64
K118A+K129A+R156Y	68

Tabla 35. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	17
R156Y	60
N140F	25
H164A	7
H193A	23
R500T	30
R500A	33
R500V	29
H199A	<10
H3A	26
H436A	26
H448A	<10
H512A	25
H96A	14
H3A+H436A	27

Tabla 36. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	27
R156Y	66
N399I	33
L34F	35
Q149E	35
S332P	36
K129A	50
K21Q+K129A	54
K129A+K275Q	56
Q68F	6
T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T	53

Tabla 37. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 12 días a +37 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	8
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	52
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	47
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	67

	Mutaciones	% Actividad residual
	Q68H+R156Y+G200P+N331F	47
	Q68H+R156F+G200P+N331F	66
5	Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	41
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	54
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	44
	Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	44
10	Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	37
	Q68H+R156Y+H193T+D366H	36
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	50
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	56
15	Q68H+T92V+R156Y+H193T	37
	Q68H+T92V+R156F+H193T	37
	Q68H+R156Y+H193T	44
20	Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	34
	Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	28
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+ M310V+E446K	47
	Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	47
25	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	56

Tabla 38. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

	Mutaciones	% Actividad residual
30	Id. de sec. n.º: 3	19
	R156Y	49
	G200S	28
	G200D	25
35	G200Y	12
	G200L	<5
	G200P	37
	G200W	<5
40	G200I	<5
	G200N	9
	G200F	<5
	G200V	9
45	G200H	12
	G200Q	19
	G200C	17
50	G200A	24
	G200M	6
	G200K	11
	G200E	48
55	G200R	<5
	G200T	5

Tabla 39. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

	Mutaciones	% Actividad residual
60	Id. de sec. n.º: 3	13
	R156Y	45
	K21Q+K129A	34
65	K129A+K275Q	39

Mutaciones	% Actividad residual
T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T	43
N399I	24
L34F	22
Q149E	23
S332P	24
K129A	58
G518D	19
K118A+K129A	73
K118A	48
K129A+K169A	40

Tabla 40. Muestras de enzimas purificadas almacenadas durante 5 días a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	<5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	73
Q68H+R156Y+H193T	63
Q68H	13
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	70
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	44
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	46
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	83
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	77
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	85

Tabla 41. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 5 días a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	<5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331K	70
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H	42
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331Q	24
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	33
Q68H+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	74
Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	87
K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	54
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N	53
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T	69
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	75
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	52

Tabla 42. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	13
R156Y	43
S76M	21
S76I	36
S76E	19
S76R	26

Mutaciones	% Actividad residual
S76K	27
S76V	39
S76R	24

Tabla 43. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	20
R156Y	51
K118A+R156Y	62
R197A	<5
R20A	26
R267A	26
R295A	23
R314A	<10
R340A	23
A221K	25
M290R	23
M373Q	25
V397S	25
T417K	27
N441G+A442E+S443D	30
S467R+G468S+A469T	29
I473T	24
A490R	32
T517A+G518D	31
V431E	29
S76W+G200P+A224P	58
S76W+G200P	59
G200P+A224P	56
S76T	42
M310V	31
G200P	47
G200E	59
M310V+N399I	<10
Q68W	<5

Tabla 44. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	8
R156Y	40
Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T	89
Q68H+T92V+K118A+S123P+K129A+Q137E+R156Y+G200P+ N331F	88
T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	88
S76W+G200P+A224P	44
S76W+G200P	45
G200P+A224P	48
S76T	26
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L	91
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	95

ES 3 023 360 T3

Mutaciones	% Actividad residual
G200P	39

Tabla 45. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 9 días a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	<5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331K	46
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H	19
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331Q	9
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	17
Q68H+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	48
Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	65
K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	31
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N	30
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T	41
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	50
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	30

Tabla 46. Muestras de enzimas purificadas almacenadas durante 9 días a +46 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	<5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	52
Q68H+R156Y+H193T	34
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	45
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	14
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	18
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	56
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	47
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	52
Q68H+R156Y+H193T	31

Tabla 47. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 30 días a +37 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	<5
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	33
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	42
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	52
Q68H+R156Y+G200P+N331F	41
Q68H+R156F+G200P+N331F	58
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	41
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	42
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	50
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	32
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	33
Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	28
Q68H+R156Y+H193T+D366H	25
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	41

	Mutaciones	% Actividad residual
5	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	43
	Q68H+T92V+R156Y+H193T	27
	Q68H+T92V+R156F+H193T	23
	Q68H+R156Y+H193T	33
	Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	28
10	Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	21
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+ M310V+E446K	35
	Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	35
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	46

Tabla 48. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

	Mutaciones	% Actividad residual
20	Id. de sec. n.º: 3	15
	R156Y	49
	A83S	15
	A83N	9
	A83Y	10
25	A83H	14
	A83I	8
	A83L	10
	A83R	16
30	A83D	17
	A83T	12
	A83E	31
	L34V	22
35	L34M	19
	L34I	24
	M310I	21
	M310V	20
40	M310L	18

Tabla 49. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 3 días a +35 °C.

	Mutaciones	% Actividad residual
45	Id. de sec. n.º: 3	61
	R156Y	89
	N331K	57
	N331R	54
	N331L	39
50	N331H	62
	N331G	59
	N331M	70
	N331W	55
	N331S	58
55	N331V	57
	N331T	46
	N331Y	55
	N331I	47
	N331A	87
60	N331Q	82

Mutaciones	% Actividad residual
N331C	70
N331E	58
N331D	63
N331P	26
N331F	51

Tabla 50. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 16 horas a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	20
R156Y	58
I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T104A+Q137E+N153K+R156Q+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+N415S+D420G+T421I+S424H+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*	72
I10V+D33E+M40L+A41T+Q67M+Y73F+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+T374A+S416A+D444Y+A469E+K470T+ I473G+T517A+S522*	71
I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+H164N+N168K+T172A+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+S522P+P523V+V524E	78
I10V+F17S+D33E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+E489A+A490V+T517A+ S522*	74
I10V+F17S+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+T320A+I337L+M356L+T374A+V397A+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+T517A+S522P+P523V+ V524E	73
I10V+F17S+D33E+M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+V219A+D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+K470T+I473S+ V477I	64
I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+T104A+Q137E+R156Q+V159A+H164N+N168K+T172A+I222V+V228I+ D249N+V272A	66
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	98
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	Aprox. 100

Tabla 51. Muestras de enzimas filtradas en condiciones estériles almacenadas durante 2 días a +44 °C.

Mutaciones	% Actividad residual
Id. de sec. n.º: 3	<5
R156Y	20
Q68H+R156Y	61
Q68H+T92V+K118A+R156Y	66
Q68H+T92V+R156Y	68
Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H	74
Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H	65
Q68H+T92V+K118R+R156F	63
Q68H+K118R+R156Y	68
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	69
Q68H+K118R+R156Y+G200P	74
Q68H+K118R+R156F	66
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	79
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	91
Q68H	55

ES 3 023 360 T3

D33V+Q68H+N168H+V450I	70
S123T	10
K129A	10

Composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa

Composiciones 1-8: Composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa adecuadas para lavadoras de carga frontal.

Ingrediente	Composición (% en peso de la composición)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ácido alquilbencenosulfónico	7	11	4,5	1,2	1,5	16,3	5,2	4
Alquil C ₁₂₋₁₄ etoxi 3 sulfato sódico	2,3	3,5	4,5	4,5	7	15	1,8	2
8-etoxilato de alquilo C ₁₄₋₁₅	5	8	2,5	2,6	4,5	4	3,7	2
Óxido de alquildimetilamina C ₁₂	-	-	0,2	-	-	-	-	-
Cloruro de alquilhidroxietildimetilamonio C ₁₂₋₁₄	-	-	-	0,5	-	-	-	-
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	2,6	4	4	2,6	2,8	7,2	2,6	1,5
Ácido cítrico	2,6	3	1,5	2	2,5	4,1	2,6	2
Proteasa (Purafect® Prime)	0,5	0,7	0,6	0,3	0,5	2	0,5	0,6
Amilasa (Natalase®)	0,1	0,2	0,15	-	0,05	0,5	0,1	0,2
Mananasa (Mannaway®)	0,05	0,1	0,05	-	-	0,1	0,04	-
Xiloglucanasa* (mg aep/100 g detergente)	1	4	3	3	2	8	2,5	4
Copolímero aleatorio de injerto ¹	1	0,2	1	0,4	0,5	0,3	0,3	1
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	0,4	2	0,4	0,2	1,5	0,2	0,7	0,3
Dimetil quat de hexametilendiamina etoxilada	-	-	-	0,4	-	-	-	-
Polietilenimina etoxilada ²	-	-	-	-	-	3	-	-
Polímero limpiador de grasa alcoxilado anfifílico ³	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3
Polímero para la liberación de la suciedad con bloques cortos de politereftalato de 1,2 propileno dietoxilado.	-	-	-	-	-	-	0,3	-
Ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)	0,2	0,3	-	-	0,2	-	0,2	0,3
Ácido hidroxietano difosfónico	-	-	0,45	-	-	1,6	-	0,1
FWA	0,1	0,2	0,1	-	-	0,2	0,05	0,1
Disolventes (1,2 propanodiol, etanol), estabilizantes	3	4	1,5	1,5	2	1,9	2	1,5
Estructurante derivado del aceite de ricino hidrogenado	0,4	0,4	0,3	0,1	0,3	-	0,4	0,5
Ácido bórico	1,5	2,5	2	1,5	1,5	0,5	1,5	1,5
Formiato sódico	-	-	-	1	-	-	-	-
Inhibidor de proteasas reversible ⁴	-	-	0,002	-	-	-	-	-
Perfume	0,5	0,7	0,5	0,5	0,8	1,7	0,5	0,8
Suspensión acuosa de microcápsulas de perfume (30 %am)	0,2	0,3	0,7	0,2	0,05	-	0,9	0,7
Tinte mordiente de tiofeno etoxilado							0,007	0,008
Tampones (hidróxido sódico, monoetanolamina)	Hasta pH 8,2							
Agua y componentes minoritarios (antiespumante, estética)	Hasta el 100 %							

Composiciones 9-16: Composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa adecuadas para lavadoras de carga superior.

Ingrediente	Composición
-------------	-------------

ES 3 023 360 T3

		(% en peso de la composición)			
		9	10	11	12
5	Alquiletoxi(1,8)sulfato C ₁₂₋₁₅	20,1	15,1	20,0	15,1
	Sulfonato de alquilbenceno C _{11,8}	2,7	2,0	1,0	2,0
	Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	6,5	4,9		4,9
	9-etoxilato de alquilo C ₁₂₋₁₄	0,8	0,8	0,8	0,8
10	Óxido de dimetilamina C ₁₂			0,9	
	Ácido cítrico	3,8	3,8	3,8	3,8
	Ácido graso C ₁₂₋₁₈	2,0	1,5	2,0	1,5
15	Proteasa (Purafect® Prime)	1,5	1,5	0,5	1,5
	Amilasa (Natalase®)	0,3	0,3	0,3	0,3
	Amilasa (Stainzyme®)				
	Mananasa (Mannaway®)	0,1			
20	Pectato Liasa (Pectawash®)	0,1			
	Xiloglucanasa*				
	(mg aep/100 g detergente)	5	13	2	5
	Bórax	3,0	3,0		
25	Na & formiato de Ca	0,2	0,2		0,2
	Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)- bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	1,6	1,6	3,0	1,6
	Copolímero aleatorio de injerto ¹	0,4	0,2	1,0	0,5
30	Ácido dietilentriamino pentaacético	0,4	0,4	0,4	0,4
	Tinopal AMS-GX	0,2	0,2	0,2	0,2
	Tinopal CBS-X				
	Polímero limpiador de grasa alcoxlado anfifílico ³	1,0	1,3	1,3	1,4
35	Texcare 240N (Clariant)				1,0
	Etanol	2,6	2,6	2,6	2,6
	Propilenglicol	4,6	4,6	4,6	4,6
	Dietilenglicol	3,0	3,0	3,0	3,0
40	Polietilenglicol	0,2	0,2	0,2	0,2
	Monoetanolamina	2,7	2,7	2,7	2,7
	Trietanolamina				
	NaOH	Hasta pH 8,3	Hasta pH 8,3	Hasta pH 8,3	Hasta pH 8,3
45	Supresor de las jabonaduras				
	Colorante	0,01	0,01	0,01	
	Perfume	0,5	0,5	0,5	0,5
	Suspensión acuosa de microcápsulas de perfume (30 %am)	0,2	0,5	0,2	0,3
50	Tinte mordiente de tiofeno etoxilado				
	Agua	Resto	Resto	Resto	Resto
		Composición (% en peso de la composición)			
		13	14	15	16
60	Alquiletoxi(1,8)sulfato C ₁₂₋₁₅	13,7	16,7	10,0	9,9
	Sulfonato de alquilbenceno C _{11,8}	5,5	5,6	3,0	3,9
	Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	3,0	9,0	2,0	
65	9-etoxilato de alquilo C ₁₂₋₁₄	8,0	1,5	0,3	11,5

ES 3 023 360 T3

	Óxido de dimetilamina C ₁₂				
	Ácido cítrico	3,5	3,5	2,0	2,1
	Ácido graso C ₁₂₋₁₈	4,5	2,3		0,9
5	Proteasa (Purafect® Prime)	1,0	1,8	0,5	0,5
	Amilasa (Natalase®)	0,2	0,4		
	Amilasa (Stainzyme®)				1,1
	Mananasa (Mannaway®)		0,1		
10	Pectato Liasa (Pectawash®)		0,2		
	Xiloglucanasa* (mg aep/100 g detergente)	20	1	2	3
	Bórax	2,0	3,0	3,0	3,3
15	Na & formiato de Ca	0,2		0,7	
	Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)- bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	2,0	1,6	1,3	1,2
20	Copolímero aleatorio de injerto ¹	0,6	1,0	0,8	1,0
	Ácido dietilentriamino pentaacético	0,2	0,3	0,8	
	Tinopal AMS-GX	0,2	0,3	0,1	
25	Tinopal CBS-X		0,1		0,2
	Polímero limpiador de grasa alcoxlado anfífilo ³	1,0	1,1	1,0	1,0
	Texcare 240N (Clariant)				
	Etanol	1,8	3,0	1,3	
30	Propilenglicol	3,0	4,0	2,5	
	Dietilenglicol	3,0	2,7	3,6	
	Polietilenglicol	0,1	0,3	0,1	1,4
	Monoetanolamina	4,7	3,3	1,7	0,4
35	Trietanolamina				0,9
	NaOH	Hasta pH 8,3	Hasta pH 8,3	Hasta pH 8,3	Hasta pH 8,5
	Supresor de las jabonaduras				
40	Colorante	0,01	0,01	0,01	0,0
	Perfume	0,7	0,7	0,8	0,6
	Suspensión acuosa de microcápsulas de perfume (30 %am)	0,1	0,3	0,9	1,0
45	Tinte mordiente de tiofeno etoxilado	0,002	0,004		
	Agua	Resto	Resto	Resto	Resto

Composición 17: composición detergente líquida para lavado de ropa en forma de bolsa, encapsulada en una película de poli(alcohol vinílico).

Ingrediente	Composición 17 (% en peso de la composición)
Ácido alquilbencenosulfónico	21,0
8-etoxilato de alquilo C ₁₄₋₁₅	18,0
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	15,0
Proteasa (Purafect® Prime)	1,5
Amilasa (Natalase®)	0,2
Mananasa (Mannaway®)	0,1
Xiloglucanasa* (mg aep/100 g detergente)	7
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-	2,0

ES 3 023 360 T3

	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	
	Polietilenimina etoxilada ²	0,8
5	Ácido hidroxietano difosfónico	0,8
	FWA	0,2
	Disolventes (1,2 propanodiol, etanol), estabilizantes	15,0
	Estructurante derivado del aceite de ricino hidrogenado	0,1
10	Perfume	1,6
	Tinte mordiente de tiofeno etoxilado	0,004
	Tampones (hidróxido sódico, monoetanolamina)	Hasta pH 8,2
	Agua y componentes minoritarios (antiespumante, estética)	Hasta el 100 %

Ejemplos 18-29

Se muestran a continuación composiciones detergentes granuladas producidas según la invención adecuadas para lavado de tejidos.

	18	19	20	21	22	23
Alquilbenceno sulfonato lineal con una longitud de cadena de carbono alifática de C ₁₁ -C ₁₂	15	12	20	10	12	13
Otros tensioactivos	1,6	1,2	1,9	3,2	0,5	1,2
25 Agente(s) reforzante(s) de la detergencia de tipo fosfato	2	25	4	3	2	-
Zeolita		1		1	4	1
Silicato	4	5	2	3	3	5
30 Carbonato sódico	9	20	10	17	5	23
Poliacrilato (MW 4500)	1	0,6	1	1	1,5	1
Polímero limpiador de grasa alcoxlado anfifílico ³	0,2	-	0,3	0,4	-	1,0
Carboximetilcelulosa (Finnfix BDA de CPKelco)	1	-	0,3	-	1,1	-
35 Xiloglucanasa* (mg aep/100 g detergente)	1,5	2,4	1,7	0,9	5,3	2,3
Otras enzimas en polvo	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Abrillantador(es) fluorescente(s)	0,16	0,06	0,16	0,18	0,16	0,16
40 Ácido dietilentriaminopentaacético o ácido etilendiaminotetraacético	0,6		0,6	0,25	0,6	0,6
MgSO ₄	1	1	1	0,5	1	1
Blanqueador(es) y activador(es) del blanqueador	6,88		6,12	2,09	1,17	4,66
Sulfato/Humedad/perfume	Resto hasta 100 %					

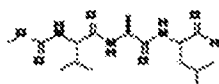
	24	25	26	27	28	29
Alquilbenceno sulfonato lineal con una longitud de cadena de carbono alifática de C ₁₁ -C ₁₂	8	7,1	7	6,5	7,5	7,5
50 Otros tensioactivos	2,95	5,74	4,18	6,18	4	4
Silicato laminar	2,0	-	2,0	-	-	-
Zeolita	7	-	2	-	2	2
Ácido cítrico	3	5	3	4	2,5	3
55 Carbonato sódico	15	20	14	20	23	23
Silicato	0,08	-	0,11	-	-	-
Agente para liberar la suciedad	0,75	0,72	0,71	0,72	-	-
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico	1,1	3,7	1,0	3,7	2,6	3,8
60 Polímero limpiador de grasa alcoxlado anfifílico ³	0,2	0,1	0,7	0,5	0,4	1,0
Carboximetilcelulosa (Finnfix BDA de CPKelco)	0,15	-	0,2	-	1	-
Xiloglucanasa* (mg aep/100 g detergente)	3,1	2,34	3,12	4,68	3,52	7,52
Otras enzimas en polvo	0,65	0,75	0,7	0,27	0,47	0,48
65 Blanqueador(es) y activador(es) del blanqueador	16,6	17,2	16,6	17,2	18,2	15,4
Sulfato/Agua y Otras sustancias	Resto hasta 100 %					

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

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

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

⁴ Inhibidor de la proteasas reversible de estructura:



* Nota: todos los niveles de enzima se expresan como % de materia prima enzimática, excepto para la xiloglucanasa cuyo nivel se proporciona en mg de proteína enzimática activa por 100 g de detergente.

No debe entenderse que las dimensiones y los valores expuestos 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 expuesta como "40 mm" se refiere a "aproximadamente 40 mm".

REIVINDICACIONES

1. Una composición detergente que comprende una variante aislada de una xiloglucanasa precursora, teniendo la variante al menos un 75 % de identidad con la Id. de sec. n.º: 3 y que comprende una alteración de la xiloglucanasa precursora en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los números de posición 156, 68, 123, 118, 200, 129, 137, 193, 92, 83, 149, 34, 340, 332, 9, 76, 331, 310, 324, 498, 395, 366, 1, 374, 7, 140, 8, 14, 21, 211, 37, 45, 13, 78, 87, 436, 101, 104, 111, 306, 117, 119, 414, 139, 268, 142, 159, 164, 102, 168, 176, 180, 482, 183, 202, 206, 217, 4, 222, 19, 224, 228, 232, 2, 240, 244, 5, 247, 249, 328, 252, 259, 406, 267, 269, 275, 179, 166, 278, 281, 288, 298, 301, 18, 302, 165, 80, 303, 316, 169, 322, 120, 146, 342, 348, 147, 353, 380, 468, 382, 383, 38, 384, 389, 391, 10, 392, 396, 177, 397, 399, 409, 237, 413, 253, 415, 418, 40, 443, 445, 148, 449, 225, 450, 454, 3, 455, 456, 299, 461, 470, 204, 476, 488, 347 y 507, posición que corresponde a una posición en la secuencia de aminoácidos Id. de sec. n.º: 3, que comprende una alteración en 156, y en donde

a) la alteración o alteraciones son

- i) una inserción de un aminoácido corriente abajo del aminoácido que ocupa la posición, y/o
- ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o
- iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición con un aminoácido diferente;

b) la xiloglucanasa precursora es una xiloglucanasa de la familia 44, y en donde la xiloglucanasa precursora consiste en la secuencia Id. de sec. n.º: 3; y

c) la variante tiene actividad de xiloglucanasa,

en donde la variante comprende una o más de las siguientes combinaciones de alteraciones:

I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T104A+Q137E+N153K+R156Q+V219A+I222V+V28I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+N415S+D420G+T421I+S424H+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*;

I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+T104A+Q137E+R156Q+V159A+H164N+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A;

K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P;

D37G,N+K129A+R156Y;

Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F;

Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+K118R+R156F,Y;

Q68H+K118R+R156Y+G200P;

Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F;

Q68H+K129A,T+R156K+G200P+N331F;

Q68H+R156F,V,Y+G200P+N331F;

Q68H+R156Y;

Q68H+R156Y+H193T;

Q68H+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V;

Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+T92A,D,I,S,V,Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H,K,Q;

Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T;

Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V;

Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T;

ES 3 023 360 T3

5	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N; Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T; Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L; Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F; Q68H+T92V+K118A,R+R156Y,F; Q68H+T92V+K118A+S123P,T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;
10	Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H; Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C; Q68H+T92V+R156F,V,Y+G200P+M310V; Q68H+T92V+R156F,V,Y+G200P+M310V+N331F; Q68H+T92V+R156F,Y+H193T;
15	Q68H+T92V+R156F,Y+H193T+D366H; Q68H+T92V+R156F,Y+H193T+G200P+M310V; Q68H+T92V+R156Y;
20	G78A+K118A++K129A+R156Y; G78A+K118A+K129A+R156Y; G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F; G78A+K118A+K129A+R156Y+K169A;
25	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y; G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F; G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A; T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;
30	T92V+K118A+K129A+R156Y; T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F; T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F; T92V+K129A+R156Y;
35	T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y; K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F; K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F; K118A+K129A+R156Y;
40	K118A+K129A+R156Y+A224P; K118A+K129A+R156Y+G200P; K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F; K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;
45	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I; K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F; K118A+K129A+R156Y+K470T; K118A+R156Y;
50	K118A+R156Y+G200P; S123T+K129A+R156Y; K129A+Q137E+R156Y; K129A+Q137E+R156Y+G200P;
55	K129A+Q137E+R156Y+K470T; K129A+Q137E+V139K+N140F+Q147S+R156Y; K129A+R156Y;
60	K129A+R156Y+A177T+V179I+A183S; K129A+R156Y+A328G; K129A+R156Y+D247G; K129A+R156Y+D249G,N,S;
65	K129A+R156Y+D303I,K,S,V; K129A+R156Y+D324N; K129A+R156Y+D366H+T374A; K129A+R156Y+D461N,Q,T;

ES 3 023 360 T3

- 5 K129A+R156Y+E288Q;
K129A+R156Y+G200P;
K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K;
K129A+R156Y+H164N;
K129A+R156Y+H436Y;
K129A+R156Y+I10V+V14I+D19E;
K129A+R156Y+I222V+A224P+V228I+V232A;
10 K129A+R156Y+K176P,S;
K129A+R156Y+K275T;
K129A+R156Y+K322I+K454Q;
K129A+R156Y+K406N+N415G;
15 K129A+R156Y+K454Q;
K129A+R156Y+L380F+N383Y+D384G+N389T;
K129A+R156Y+N298F+E299N+G301T;
K129A+R156Y+N302K+D303L,S;
20 K129A+R156Y+N331F;
K129A+R156Y+P507A;
K129A+R156Y+R267H;
K129A+R156Y+R409L,T;
25 K129A+R156Y+S443D+K445S+L449I+V450I+S455N+M456Y;
K129A+R156Y+T244D;
K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y;
K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A;
30 R156A,E,F,I,K,M,Q,T,V,W,Y; o
R156Y+N331F.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde la variante comprende una alteración en una o más de las posiciones correspondientes a la posición 123, o la posición 68, o la posición 118, o la posición 200, o la posición 129, o la posición 137, o la posición 193, o la posición 92, o la posición 76, o la posición 331, cuya posición corresponde a una posición en la secuencia de aminoácidos Id. de sec. n.º 3, preferiblemente en donde la variante comprende la sustitución en la posición 156 y una o más sustituciones en una o más sustituciones adicionales, seleccionadas del grupo que consiste en los números de posición 10, 13, 14, 19, 37, 68, 78, 92, 118, 123, 129, 137, 139, 140, 147, 159, 164, 165, 169, 176, 177, 179, 183, 200, 204, 211, 222, 224, 244, 247, 249, 259, 267, 268, 269, 275, 288, 299, 301, 302, 303, 310, 324, 328, 331, 366, 380, 383, 384, 389, 406, 409, 415, 436, 443, 445, 449, 450, 454, 455, 456, 461, 470 y 507.
3. La composición según la reivindicación 2, en donde la variante comprende sustituciones en la posición 129 y la posición 156.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante comprende una o más de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: Q68H,N,L; S123P,T; R156Y,F,V,I,K,W,M; K118A,R; G200P,E,S,D; K129T,A,S; Q137E; H193T,S,D; T92V,I,A,S; A83E; Q149E; L34F,I,V; R340T,N; S332P; T9D; S76W,V,I,K,R,T; N331F,C; M310I,V,L; D324N; G498A,D; D395G y D366H.
5. La composición según la reivindicación 4, en donde la variante comprende una o más de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: Q68H; S123P; R156Y,F; K118A; G200P,E; K129T,A; Q137E; H193T; T92V y N331F.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante comprende una o más de las siguientes combinaciones de sustituciones:
- R156Y
Q68H+R156Y
K129A+R156Y
S123T+K129A+R156Y
K129A+R156Y+G200P
Q68H+K118R+R156F
Q68H+R156Y+H193T

- Q68H+R156F+G200P+N331F
 Q68H+T92V+K118A+R156Y
 K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y
 Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F
 K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F
 T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
 G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A
 Q68H+T92V+Q137E+R156Y+G200P+N331F
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F
 Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F
 Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
 Q68H+T92V+K118A+S123P,T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F
7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el número total de alteraciones en la variante es dos, incluso preferiblemente tres, incluso más preferiblemente cuatro, incluso más preferiblemente cinco, incluso más preferiblemente seis, incluso más preferiblemente siete, incluso más preferiblemente ocho, incluso más preferiblemente nueve, y lo más preferiblemente diez.
8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la xiloglucanasa precursora de la Id. de sec. n.º 3.
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es una composición detergente líquida para lavado de ropa o está en forma sólida.
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende uno o más ingredientes seleccionados de:
- (a) polímero alcoxilado anfifílico para limpiar grasa;
- (b) copolímero aleatorio de injerto, en donde el copolímero aleatorio de injerto comprende:
- (i) cadena principal hidrófila que comprende monómeros seleccionados del grupo que consiste en: ácidos carboxílicos de C₁-C₆ insaturados, éteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, unidades de azúcar, unidades de alcoxi, anhídrido maleico, polialcoholes saturados tales como glicerol, y mezclas de los mismos; y
- (ii) cadena(s) lateral(es) hidrófoba(s) seleccionadas del grupo que consiste en: grupo alquilo C₄-C₂₅, polipropileno, polibutileno, éster vinílico de un ácido monocarboxílico de C₁-C₆ saturado, éster alquílico de C₁-C₆ de ácido acrílico o metacrílico, y mezclas de los mismos;
- (c) un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n)(CH₃)-N⁺-C_xH_{2x}-N⁺-(CH₃)-bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % en peso de la composición, de un secuestrante de calcio que tiene una constante de estabilidad condicional a pH 8 superior a aproximadamente 4.
12. Uso de una xiloglucanasa en una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para transmitir ventajas de liberación de suciedad al algodón durante un proceso de lavado posterior.

Figura 1A

[illegible]

Figura 1B

SRQ_ID	NO_3	KLYRNDGKXSTFGDTSVSAQTSIDIVNSSVTHASVTINASDKELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
SRQ_ID	NO_5	KLYRNDGCKSSTFGDISVRAQTSIDIVNSSVTHASVTDA SYKELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SCHTYSGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTAGNDT-PV---	523
SRQ_ID	NO_7	KLYRNDGKKNATFGDISVRAQTSIDIVNSSVTHASVTDAS YKELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SCHTYSGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTAGNDT-PVPPV	526
	q1a2d0	KLYRNDGKXSTFGDTSVSAQTSIDIVNSSVTHASVTINASDKELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	p22719	KLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	p11140	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	a1d330	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	q977y3	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	abuzx7	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	q9a934	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	q2zh56	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	p22533	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	q1e9a6	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
	q234f9	NLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
Consenso	01	KLYRNDGKXSGPGSKVDATSDTENSSVYASVTDHENS ELHLVVMKSMDSAFDAQFDL-SGAKTYISGRVWGFDKNSSQIKFAAPITQISQNRFTYTVVPLTAYHIVLVTENDTSPV---	524
Consenso	02	KI-T-----NNGTY-SINIKCATNVVMPH-AINDASYKVTLVLI-RSMTQPTDVNINIEGSGTQSKAKIYAVYKTNPHYKMNVSQVDSKLSLHL-DPSTYCNVSVSTGAPT-----	458
Consenso	03	QM-L-----KAC--N-L-P-S-P-TSIV-AF---VSGEGNTMDVMIL--YLSEKLTVP-SV-TNDRK-KI-R--SLTGGTEVRQAGLIDDLDES-TLAVKI-NQNGVSI-IBSGHAA-----	339
Consenso	04	---N-----S-R---K-T-N-G-PN-----BNE-NA-----T--DPKDNIOQ-T-QM-DABPY-IO-Q--Q-PGD-ED-NLLTA-V8-QN-VINT--K---ALH--BDATY6-----	214
Regla		460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570...	