

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 826**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2018** **E 18154223 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2023** **EP 3357994**

54 Título: **Composiciones limpiadoras que comprenden variantes de amilasa**

30 Prioridad:

01.02.2017 IN 201711003745

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

17.04.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ANDERSEN, CARSTEN;
GHADIYARAM, CHAKSHUSMATHI;
IYER, PADMA VENKATACHALAM;
SAINATHAN, RAJENDRA KULOTHUNGAN y
DAMAGER, IBEN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 2 965 826 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

Composiciones limpiadoras que comprenden variantes de amilasa

5 Referencia a un listado de secuencias

Esta solicitud contiene un listado de secuencias en un soporte informático de lectura. El soporte informático de lectura se ha incorporado como referencia en la presente memoria.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones limpiadoras que comprenden variantes de una alfa-amilasa que tiene una capacidad limpiadora mejorada con respecto a su amilasa progenitora en procesos de tratamiento de superficies con agua fría.

15 Antecedentes de la invención

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

Entre las primeras alfa-amilasas bacterianas utilizadas se encontraban una alfa-amilasa procedente de *B.licheniformis*, también denominada Termamyl, que ha sido ampliamente caracterizada y se ha determinado la estructura cristalina para esta enzima. Las amilasas alcalinas, tales como AA560 forman un grupo particular de alfa-amilasas que han encontrado uso en detergentes. Muchas de estas amilasas bacterianas conocidas se han modificado para mejorar su funcionalidad en una aplicación determinada. Amilasas de *Bacillus*, tales como Termamyl, AA560 (WO 2000/060060) y SP707 (descrita por Tsukamoto y col., 1988, Biochem. Biophys. Res. Comm. 151: 25-31) forman un grupo particular de alfa-amilasas que han encontrado uso en detergentes. Estas amilasas se han modificado para mejorar la estabilidad en los detergentes. WO 96/23873, p. ej., describe eliminar los aminoácidos 181+182 o los aminoácidos 183+184 de SP707 (Id. de sec. n.º: 7 de WO 96/23873) para mejorar la estabilidad de esta amilasa. WO 96/23873 describe además modificar la amilasa SP707 sustituyendo M202 con, p. ej., una leucina para estabilizar la molécula hacia la oxidación. Por lo tanto, se sabe modificar amilasas para mejorar ciertas propiedades. Las amilasas modificadas también se describen en WO2011/076897, WO2014/183920, WO2014/183921, WO97/41213, EP3121270A, WO00/60060, WO96/23873, WO2015/189370, US2014/206026, WO2016/079305, WO2013/001078, WO2015/091959, WO2015/189372, WO2015/189371 y EP2357220A.

Por motivos ambientales, es cada vez más importante disminuir las temperaturas de lavado de ropa, lavado de vajillas y/o en otros procesos de limpieza. Sin embargo, la mayoría de las enzimas incluidas las amilasas tienen una temperatura óptima que está por encima de la temperatura habitualmente utilizada en el lavado a baja temperatura. La alfa-amilasa es una enzima fundamental a utilizar en composiciones detergentes, y su uso se ha vuelto cada vez más importante para la eliminación de manchas de almidón durante el lavado de ropa o el lavado de vajillas. Por tanto, es importante descubrir variantes de alfa-amilasas que retengan su capacidad limpiadora, efecto de eliminación de manchas y/o su actividad cuando se disminuye la temperatura. Sin embargo, a pesar de la eficacia de las actuales composiciones de enzimas detergentes, existen muchas manchas que son difíciles de eliminar por completo. Estos problemas se agravan por el creciente uso de bajas temperaturas de lavado (p. ej., agua fría) y ciclos de lavado más cortos. Así, es deseable disponer de enzimas amilolíticas que puedan actuar a baja temperatura y al mismo tiempo conservar o aumentar otras propiedades deseables tales como la actividad específica (actividad amilolítica), la estabilidad y/o la capacidad limpiadora para permitir una buena limpieza en ciclos de lavado más cortos.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones limpiadoras que comprendan variantes de alfa-amilasas que puedan utilizarse en procesos de lavado, lavado de vajilla y/o limpieza a baja temperatura. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar una composición limpiadora que comprenda variantes de alfa-amilasa que tengan una capacidad limpiadora mejorada a baja temperatura en comparación con la alfa-amilasa original o en comparación con las composiciones limpiadoras que comprenden la alfa-amilasa de cualquiera de las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

55 Resumen de la invención

La presente invención proporciona una composición limpiadora que comprende:

60 (a) una variante de una alfa-amilasa original, en donde la variante comprende (i) una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304, y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1, (ii) la variante tiene al menos 80, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7 u 8, (iii) la variante tiene actividad alfa-amilasa, y (iv) la variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- 5 X1*+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
- 10 X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
- 15 X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
- 20 X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
- 25 X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
- 30 X1*+X109A+X280S+X391V;
X1*+X109A+X284R+X391A;
X1*+X109A+X284F+X391A;
- 35 X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
- 40 X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
X1*+X109S+X280S+X391A;
- 45 X1*+X109A+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
- 50 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
X7A+X284H+X320A+X323N;
- 55 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
- 60 X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
- 65 X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;

5

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y

10

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A y

(b) y un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9 % en peso.

La invención también proporciona un método para tratar una superficie, preferiblemente un material textil, que comprende

15

(i) formar una solución de lavado acuosa que comprende agua y una composición limpiadora de ese tipo,

(ii) tratar la superficie con la solución de lavado acuosa preferiblemente a una temperatura de 5 o 10 a 40 °C, o preferiblemente 35 °C o menos, más preferiblemente a una temperatura de 30 °C o menos, o a una temperatura de 20 °C o menos; y

20

(iii) enjuagar la superficie.

Descripción detallada de la invención

25

La presente invención proporciona una composición limpiadora que comprende:

(a) una variante de una alfa-amilasa original, en donde la variante comprende (i) una modificación en una o más posiciones correspondientes a 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304 y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1, (ii) la variante tiene al menos 80, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, (iii) la variante tiene actividad de alfa-amilasa; y (iv) la variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:

35

X1*+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;

40

X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;

45

X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;

50

X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;

55

X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;

60

X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X391V;

65

X1*+X109A+X284R+X391A;

X1*+X109A+X284F+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

5 X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;

10 X1*+X109S+X280S+X391A;

X1*+X109A+X284H+X391A;

15 X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;

20 X7A+X284H+X320A+X323N;

X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;

25 X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;

30 X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;

35 X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

40 X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A y

45 (b) un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9 % en peso.

Definiciones

50 Variante alélica: El término “variante alélica” significa 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.

55 Alfa-amilasa: El término “alfa-amilasa” (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1) constituye un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligo y polisacáridos lineales y ramificados con enlace 1,4-glucosídico. Para los fines de la presente invención, la actividad alfa-amilasa se determina según el procedimiento descrito en la sección de Ejemplos. En un aspecto, las variantes de la presente invención tienen al menos 20 %, p. ej., al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %

60 o al menos 100 % de la actividad alfa-amilasa del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 1.

Aminoácido: El término “aminoácido” como se utiliza en la presente memoria incluye los veinte aminoácidos codificados genéticamente estándar y sus estereoisómeros correspondientes en la forma “d” (en comparación con la forma “l” natural), omega-aminoácidos, otros aminoácidos de origen natural, aminoácidos no convencionales (p. ej., aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquil aminoácidos, etc.) y aminoácidos derivatizados químicamente. Los derivados químicos de uno o más aminoácidos pueden lograrse mediante reacción con un grupo lateral funcional.

Dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que se han derivatizado grupos amino libres para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carboxibenzoxilo, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres e hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados O-acilo u O-alquilo. También se incluyen como derivados químicos aquellos péptidos que contienen derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo: 4-hidroxiprolina puede sustituirse por prolina; 5-hidroxilisina puede sustituirse por lisina; 3-metilhistidina puede sustituirse por histidina; la homoserina puede sustituirse por serina y la ornitina por lisina. Los derivados también incluyen péptidos que contienen una o más adiciones o deleciones siempre que se mantenga la actividad requerida. Otras modificaciones incluidas son amidación, acilación terminal amino (p. ej., acetilación o amidación de ácido tioglicólico), carboxilamidación terminal (p. ej., con amoniaco o metilamina) y modificaciones terminales similares.

Cuando se enumera específicamente un aminoácido, tal como “alanina” o “Ala” o “A”, el término se refiere tanto a l-alanina como a d-alanina, salvo que se indique explícitamente lo contrario. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención, siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. Para los péptidos mostrados, cada residuo de aminoácido codificado, cuando sea apropiado, está representado por una designación de letra única, correspondiente al nombre trivial del aminoácido convencional. En una realización, los polipéptidos de la invención comprenden o consisten en l-aminoácidos.

ADNc: El término “ADNc” significa una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura sometida a corte y empalme obtenida a partir de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias intrónicas que pueden estar presentes en el correspondiente ADN genómico. El transcrito primario inicial de ARN es un precursor del ARNm que se procesa mediante una serie de etapas, incluido el corte y empalme, antes de aparecer como un ARNm maduro de corte y empalme.

Secuencia codificante: El término “secuencia codificante” significa un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante. Los límites de la secuencia codificante por lo general están determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente se inicia con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y finaliza con un codón de parada tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un polinucleótido de ADN, ADNc, sintético o recombinante.

Secuencias de control: La expresión “secuencias de control” significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o foránea (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante, o nativa o exógena entre sí. Dichas secuencias de control incluyen, aunque no de forma limitativa, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal, y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de detención de la transcripción y de la traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores que tienen el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la unión de las secuencias de control con la región codificadora del polinucleótido que codifica una variante.

Intensidad delta: Las expresiones “intensidad delta” o “valor de intensidad delta” se definen en la presente memoria como resultado de una medición de intensidad de un material de ensayo, p. ej., una muestra CS-28 (Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos) o una superficie dura. La muestra se mide con una parte de la muestra, se lava en condiciones idénticas, como fondo. La intensidad delta es el valor de intensidad del material de ensayo lavado con amilasa restando el valor de intensidad del material de ensayo lavado sin amilasa.

Beneficio de detergencia enzimática: La expresión “beneficio de detergencia enzimática” utilizada en la presente memoria, se refiere al efecto ventajoso que una enzima puede añadir a un detergente en comparación con el mismo detergente sin la enzima. Los importantes beneficios de detergencia que pueden proporcionar las enzimas son la eliminación de manchas con muy poca o ninguna suciedad visible después del lavado y/o limpieza, la prevención o reducción de la redeposición de la suciedad liberada en el proceso de lavado (un efecto que también se denomina antirredeposición), restaurando total o parcialmente la blancura de los tejidos que originalmente eran blancos pero después de un uso repetido y el lavado han obtenido un aspecto grisáceo o amarillento (un efecto que también se denomina blanqueamiento). Los beneficios del cuidado de tejidos, que no están directamente relacionados con la eliminación de manchas catalítica o la prevención de la redeposición de suciedad, también pueden ser importantes para los beneficios de la detergencia de la enzima. Ejemplos de tales beneficios para el cuidado de tejidos son la prevención o reducción de la transferencia de tinte de un tejido a otro u otra parte del mismo tejido (un efecto que también se denomina inhibición por transferencia de tinte o antiretroteñido), la eliminación de fibras salientes o rotas de una superficie de tejido para disminuir la tendencia a la formación de pelusas o eliminar las pelusas ya existentes o las bolitas (un efecto que también se denomina antiapilamiento), la mejora de la suavidad del tejido, la clarificación del color del tejido y la eliminación de partículas de suciedad que quedan atrapadas en las fibras del tejido o prenda de vestir. El blanqueamiento enzimático es un beneficio adicional de la detergencia enzimática donde la actividad catalítica generalmente se utiliza para catalizar la formación de un componente blanqueador tal como peróxido de hidrógeno u otros peróxidos.

Expresión: El término “expresión” incluye cualquier etapa implicada en la producción de la variante incluido, aunque no de forma limitativa, la transcripción, la modificación posterior a la transcripción, la traducción, la modificación posterior a la traducción, y la secreción.

5 **Vector de expresión:** El término “vector de expresión” significa una molécula de ADN, linear o circular, que comprende un segmento que codifica un polinucleótido que codifica una variante, y está unido operativamente a nucleótidos adicionales que realizan su expresión.

10 **Fragmento:** El término “fragmento” significa un polipéptido que tiene uno o más (p. ej., varios) aminoácidos ausentes del extremo amino y/o carboxilo del polipéptido de las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; en donde el fragmento tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos de las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, por ejemplo al menos 300 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 350 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 400 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 450 residuos de aminoácidos contiguos de Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

15 **Célula huésped:** El término “célula huésped” significa cualquier tipo celular susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprenda un polinucleótido descrito en la presente memoria. 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.

20 **Valor de intensidad:** La expresión “valor de intensidad” como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la medición de la capacidad limpiadora. Se mide como el brillo expresado como la intensidad de la luz reflejada por la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra se mancha, la intensidad de la luz reflejada es menor al de la muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede utilizarse para medir la capacidad limpiadora, donde un valor de intensidad más alto se correlaciona con una mayor capacidad limpiadora. Las mediciones de color se realizan con un escáner plano profesional (Kodak iQsmart, Kodak), que se utiliza para capturar una imagen del tejido lavado. Para extraer un valor de la intensidad de la luz a partir de las imágenes escaneadas, los valores de píxel de 24 bits se convirtieron en valores de rojo, verde y azul (RGB). El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores de RGB entre sí como vectores y tomando a continuación la longitud del vector resultante:

30

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

35 **Propiedad mejorada:** La expresión “propiedad mejorada” significa una característica asociada con una variante que se mejora en comparación con el precursor. Dichas propiedades mejoradas incluyen, aunque no de forma limitativa, capacidad limpiadora, actividad térmica, termoestabilidad, estabilidad en condiciones de almacenamiento y estabilidad química.

40 **Capacidad limpiadora mejorada:** Las expresiones “capacidad limpiadora mejorada” o “capacidad limpiadora potenciada” significan la capacidad de la enzima variante de proporcionar un efecto de limpieza (p. ej., eliminación de manchas) en un proceso de lavado, tal como lavado de ropa o lavado de vajillas, que se mejora en comparación con la de la amilasa original o en relación con la actividad de una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 2 o 1, p. ej., mediante una mayor eliminación de manchas. La capacidad limpiadora puede determinarse mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica, tales como el uso de un ensayo de estrés mecánico automático (AMSA). Los expertos en la técnica apreciarán que la capacidad limpiadora mejorada puede lograrse solo en algunas o quizás todas las condiciones de lavado, por ejemplo a temperaturas de lavado de 20 °C o más (tal como a 40 °C). La capacidad limpiadora mejorada puede indicarse mediante un factor de mejora (IF) por encima de 1,0, preferiblemente por encima de 1,05 en una o más de las condiciones enumeradas en el ejemplo 1, por ejemplo, en el detergente modelo A a 20 °C donde la concentración de la variante de alfa-amilasa es 0,2 mg/l, o en el detergente modelo A a 40 °C donde la concentración de la variante de alfa-amilasa es 0,05 mg/l, o en el detergente modelo J a 20 °C, donde la concentración de la variante de alfa-amilasa es 0,2 mg/l, o en el detergente modelo J a 30 °C donde la concentración de la variante de alfa-amilasa es 0,05 mg/l o en el detergente K a 20 °C, donde la concentración de la variante de alfa-amilasa es 0,2 mg/l. Las condiciones de lavado se describen en la sección de Ejemplos.

55 **Aislado:** El término “aislado” significa una sustancia en una forma o entorno que no se produce en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia no natural, (2) cualquier sustancia que incluya, aunque no de forma limitativa, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se elimina al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes naturales con los que está asociado en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre en relación con esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada aumentando la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los que está asociada naturalmente (p. ej., múltiples copias de un gen que codifica la sustancia; el uso de un promotor más fuerte que el promotor asociado naturalmente con el gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación. En un aspecto, la presente invención se refiere a una variante de alfa-amilasa aislada.

65 **Polinucleótido aislado:** El término “polinucleótido aislado” significa un polinucleótido que está modificado por la mano humana. En un aspecto, el polinucleótido aislado es al menos 1 % puro, p. ej., al menos 5 % puro, al menos 10 % puro, al menos 20 % puro, al menos 40 % puro, al menos 60 % puro, al menos 80 % puro, al menos 90 %

puro, y al menos 95 % puro, tal como se determina mediante electroforesis en gel de agarosa. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

Variante aislada: El término “variante aislada” significa una variante que está modificada por la mano humana. En un aspecto, la variante es al menos 1 % pura, p. ej., al menos 5 % pura, al menos 10 % pura, al menos 20 % pura, al menos 40 % pura, al menos 60 % pura, al menos 80 % pura, y al menos 90 % pura, tal como se determina mediante SDS-PAGE.

Baja temperatura: “Baja temperatura” es una temperatura de 5-40 °C, preferiblemente 5-35 °C, preferiblemente 5-30 °C, más preferiblemente 5-25 °C, más preferiblemente 5-20 °C, con máxima preferencia 5-15 °C y en particular 5-10 °C. En una realización preferida, “baja temperatura” es una temperatura de 10-35 °C, preferiblemente 10-30 °C o 10-25 °C, o 10-20 °C, o 10-15 °C.

Polipéptido maduro: El término “polipéptido maduro” significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccion, tal como el procesamiento N-terminal, el truncamiento C-terminal, la glucosilación, la fosforilación, etc. Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos de más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresado por el mismo polinucleótido.

Secuencia codificante del polipéptido maduro: La expresión “secuencia codificante del polipéptido maduro” significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad alfa-amilasa.

Mutante: El término “mutante” significa un polinucleótido que codifica una variante.

Construido de ácido nucleico: La expresión “construido de ácido nucleico” significa una molécula de ácido nucleico, tanto monocatenaria como bicatenaria, que está aislada de un gen natural, o se ha modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos de una forma que de otra manera no se produciría en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control. El término construido de ácido nucleico es un sinónimo del término “casete de expresión” cuando el construido de ácido nucleico incluye las secuencias de control necesarias para expresar una secuencia codificante de la presente invención.

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

Progenitor o alfa-amilasa original: El término “progenitor” o “alfa-amilasa progenitora” significa una alfa-amilasa en la que se ha realizado una alteración para producir variantes de la enzima de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido de origen natural (natural) o una variante del mismo. Por ejemplo, el progenitor puede ser la alfa-amilasa de la Id. de sec. n.º: 1 (conocida como SP722). De forma alternativa, puede significar la alfa-amilasa de la Id. de sec. n.º: 2 o cualquier alfa-amilasa adecuada, tal como las enumeradas en la presente memoria como Id. de sec. n.º: 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

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

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

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

De forma alternativa, los parámetros utilizados pueden tener 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:

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

Proceso de eliminación de almidón: La expresión “proceso de eliminación del almidón” se refiere a cualquier tipo de proceso por el que se elimina (o se convierte) el almidón, tal como en procesos de lavado donde el almidón se retira de un material textil, tal como, p. ej., la limpieza textil tal como el lavado de ropa. Un proceso de eliminación de almidón también puede ser una limpieza de superficies duras tal como el lavado de vajilla o bien pueden ser procesos de limpieza generales tal como la limpieza industrial o de lugares públicos. La expresión también abarca otros procesos de eliminación del almidón o de conversión del almidón, producción de etanol, licuefacción de almidón, eliminación de apresto, producción de papel y pulpa, fabricación de cerveza y detergentes en general.

Subsecuencia: El término “subsecuencia” significa un polinucleótido que tiene uno o más (p. ej., varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; en donde la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad alfa-amilasa.

Polinucleótido sustancialmente puro: La expresión “polinucleótido sustancialmente puro” significa una preparación de polinucleótido exenta de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para su uso en sistemas de producción de polipéptidos genomanipulados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo 10 %, como máximo 8 %, como máximo 6 %, como máximo 5 %, como máximo 4 %, como máximo 3 %, como máximo 2 %, como máximo 1 %, y como máximo 0,5 % en peso de otro material polinucleotídico con el que está asociado de forma recombinante o natural. Un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir, sin embargo, regiones naturales 5' y 3' no traducidas, como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 90 % puro, p. ej., al menos 92 % puro, al menos 94 % puro, al menos 95 % puro, al menos 96 % puro, al menos 97 % puro, al menos 98 % puro, al menos 99 % puro, y al menos 99,5 % puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

Variante sustancialmente pura: La expresión “variante sustancialmente pura” significa una preparación que contiene como máximo 10 %, como máximo 8 %, como máximo 6 %, como máximo 5 %, como máximo 4 %, como máximo 3 %, como máximo 2 %, como máximo 1 %, y como máximo 0,5 % en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma recombinante o natural. Preferiblemente, la variante es al menos 92 % pura, p. ej., al menos 94 % pura, al menos 95 % pura, al menos 96 % pura, al menos 97 % pura, al menos 98 % pura, al menos 99 %, al menos 99,5 % pura, y 100 % pura en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Las variantes de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando la variante por métodos recombinantes bien conocidos, o mediante métodos de purificación clásicos.

Beneficios para el cuidado de tejidos: La expresión “beneficios para el cuidado de tejidos”, como se utiliza en la presente memoria, se define como que no están directamente relacionados con la eliminación catalítica de manchas o la prevención de la redeposición de la suciedad; también son importantes para los beneficios de la detergencia de la enzima. Ejemplos de tales beneficios para el cuidado de tejidos son la prevención o reducción de la transferencia de tinte de un tejido a otro u otra parte del mismo tejido (un efecto que también se denomina inhibición por transferencia de tinte o antiretroteñido), la eliminación de fibras salientes o rotas de una superficie de tejido para disminuir la tendencia a la formación de pelusas o eliminar las pelusas ya existentes o las bolitas (un efecto que también se denomina antiapilamiento), la mejora de la suavidad del tejido, la clarificación del color del tejido y la eliminación de partículas de suciedad que quedan atrapadas en las fibras del tejido. El blanqueamiento enzimático es un beneficio adicional de la detergencia enzimática donde la actividad catalítica generalmente se utiliza para catalizar la formación de componente blanqueador tal como peróxido de hidrógeno u otros peróxidos u otras especies blanqueadoras”.

Variante: El término “variante” significa un polipéptido que tiene una actividad alfa-amilasa que comprende una alteración/mutación, es decir, una sustitución, inserción y/o delección, en una o más (p. ej., varias) posiciones con respecto a la alfa-amilasa original. Una sustitución significa una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir 1-3 aminoácidos adyacentes a, e inmediatamente después de, un aminoácido que ocupa una posición.

Capacidad limpiadora: En el presente contexto, el término “capacidad limpiadora” se utiliza como la capacidad de la enzima para eliminar el almidón o las manchas que contienen almidón presente en el objeto a limpiar durante, p. ej., el lavado de ropa o la limpieza de superficies duras, tal como el lavado de vajillas. La capacidad limpiadora se puede cuantificar calculando el denominado valor de intensidad (Int) definido en la descripción de AMSA o según el ensayo de capacidad limpiadora en matraz que se describe en la sección Métodos, más adelante.

Enzima de tipo silvestre: El término alfa-amilasa “natural” significa una alfa amilasa expresada por un microorganismo natural, tal como una bacteria, levadura, u hongo filamentoso encontrado en la naturaleza.

El término “capacidad limpiadora” incluye limpieza en general, p. ej., limpieza de superficies duras como en el lavado de vajillas, pero también la capacidad limpiadora de materiales textiles tal como en el lavado de ropa, y también en la limpieza industrial o de lugares públicos. Se puede medir la capacidad limpiadora mejorada comparando las intensidades delta descritas en la definición de la presente memoria

El término “capacidad limpiadora” incluye limpieza en general, p. ej., limpieza de superficies duras como en el lavado de vajillas, pero también la capacidad limpiadora de materiales textiles tal como en el lavado de ropa, y también en la limpieza industrial o de lugares públicos.

Convenciones para la designación de variantes

Los polipéptidos de la invención que tienen actividad de alfa-amilasa corresponden a variantes de una alfa-amilasa derivada de *Bacillus*, como se muestra en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Id. de sec. n.º: 1

HHNGTNGTMMQYFEWHLPNDDGNHWNRLRDDASNLNRNGITAIWIPPAWKGT SQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKG
TVRTKYGTRSQLESIAHALKNNGVQVYGDVVMNHKGGADATENVLAVEVNPNNRNQEISGDYIEAWTKFDFPGR
GNTYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNRQYKFRGDGKAWDWEVDSENGNYDYLMDYADVMDHPEVVNELRR
WGEWYTNTLNLDGFRIDAVKHKYSFTRDWLTHVRNATGKEMFAVAEFWKNDLGALENYLNKTNWNHVSFVDFVPLH
YNLYNASNSGGNYDMAKLLNGTVVQKHPMHAVTFVDNHDSSQPGESLESFVQEWFKPLAYALILTREQGYPSVFIG
DYYGIPHTSVPAKAKIDPILEARQNFAYGTHDYFDHNNIIGWTRGNTTTPNSGLATIMSDGPGGEKWMYVGQN
KAGQVWHDITGNKPGTVTINADGWANFSVNGGSVSIWVKR

Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en la Id. de sec. n.º: 1 se utiliza para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido de alfa-amilasa. Sin embargo, el experto reconocería que la secuencia de Id. de sec. n.º: 2 también puede utilizarse para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido de alfa-amilasa. La secuencia de aminoácidos de otra alfa-amilasa se alinea con el polipéptido maduro descrito en la Id. de sec. n.º: 1, y en base a la alineación, el número de posición de aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en la Id. de sec. n.º: 1 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 Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o una versión posterior. Los parámetros 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 identificación del correspondiente residuo de aminoácido en otra alfa-amilasa puede determinarse mediante una alineación de múltiples secuencias de polipéptidos utilizando varios programas informáticos que incluyen, aunque no de forma limitativa, MUSCLE (comparación múltiple de secuencias según el logaritmo de la expectativa; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066; Katoh y col., 2005, *Nucleic Acids Research* 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, *Bioinformatics* 23: 372-374; Katoh y col., 2009, *Methods in Molecular Biology* 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, *Bioinformatics* 26: 1899-1900) y EMBOSS EMMA que emplea ClustalW (1.83 o posterior; Thompson y col., 1994, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680), utilizando sus respectivos parámetros predeterminados.

Cuando la otra alfa-amilasa se ha separado del polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 1 de manera que la comparación tradicional basada en secuencia no detecta su relación (Lindahl y Eloffson, 2000, *J. Mol. Biol.* 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de emparejamiento de secuencias. Se puede conseguir una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles mediante un proceso iterativo de búsqueda en bases de datos y puede detectar homólogos remotos (Atschul y col., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Se puede conseguir incluso una mayor sensibilidad si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras proteicas. Programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, *Bioinformatics* 19: 874-881) utilizan la información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineamiento estructural, y potenciales de solvatación) como entrada de una red neuronal que predice el plegado estructural de una secuencia solicitada. Análogamente, el método de Gough y col., 2000, *J. Mol. Biol.* 313: 903-919, se puede usar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de la superfamilia presentes en la base de datos SCOP. A su vez, estos alineamientos se pueden usar para generar modelos de homología del polipéptido, y dichos modelos se pueden evaluar para determinar la precisión usando una variedad de herramientas desarrolladas a tal fin.

Para las proteínas de estructura conocida, están disponibles diferentes herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. *P. ej.*, las superfamilias de proteínas SCOP se han alineado estructuralmente, y dichas alineaciones están disponibles y se pueden descargar. Se pueden alinear dos o más estructuras proteicas usando una variedad de algoritmos tal como la matriz de distancia de alineamiento (Holm y Sander, 1998, *Proteins* 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, *Protein Engineering* 11: 739-747) y la implementación de dichos algoritmos se puede utilizar adicionalmente para investigar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (*p. ej.*, Holm y Park, 2000, *Bioinformatics* 16: 566-567).

En la descripción de las variantes de alfa-amilasa de la presente invención, la nomenclatura que se describe más adelante está adaptada para facilitar la referencia. Se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o de tres letras aceptada por la IUPAC.

Sustituciones. En las sustituciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. En consecuencia, la sustitución de, *p. ej.*, treonina por alanina en la posición 226 se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), *p. ej.*, "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411F", que representan sustituciones de glicina (G) por arginina (R) y serina (S) por fenilalanina (F) en las posiciones 205 y 411, respectivamente.

Delecciones. En las delecciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, *. En consecuencia, la delección de glicina en la posición 181 se designa como “Ser181*” o “S181*”. Las delecciones múltiples están separadas por signos de suma (“+”), *p. ej.*, “Ser181* + Thr182*” o “S181* + T182*”.

Inserciones. En las inserciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. En consecuencia, la inserción de lisina después de, *p. ej.*, glicina en la posición 195 se designa como “Gly195GlyLys” o “G195GK”. Una inserción de múltiples aminoácidos se designa como [Aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado n.º 1, aminoácido insertado n.º 2; etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como “Gly195GlyLysAla” o “G195GKA”.

En dichos casos, el resto o restos de aminoácidos insertado(s) se numeran por la adición de letras minúscula al número de posición del resto de aminoácido que precede al resto o restos de aminoácidos insertado(s). En el ejemplo anterior, la secuencia sería, por tanto:

Precursor:	Variante:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

Modificaciones múltiples. Las variantes que comprenden múltiples modificaciones se separan por signos de suma (“+”), *p. ej.*, “Arg170Tyr+Gly195Glu” o “R170Y+G195E” que representan una sustitución de arginina y glicina por tirosina y ácido glutámico en las posiciones 170 y 195, respectivamente.

Modificaciones diferentes. Cuando se pueden introducir diferentes alteraciones en una posición, las diferentes alteraciones se separan con una coma, *p. ej.*, “Arg170Tyr,Glu” representa una sustitución de arginina por tirosina o ácido glutámico en la posición 170. Así, “Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala” designa las siguientes variantes:

“Tyr167Gly+Arg170Gly”, “Tyr167Gly+Arg170Ala”, “Tyr167Ala+Arg170Gly”, y “Tyr167Ala+Arg170Ala”.

Alfa-amilasas originales

La alfa-amilasa original puede ser un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos 80 % con el polipéptido expuesto en la Id. de sec. n.º: 1.

En un aspecto, la alfa-amilasa original tiene una identidad de secuencia con respecto al polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1 de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, *p. ej.*, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 o 100 %, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original difiere en no más de diez aminoácidos, *p. ej.*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1.

La alfa-amilasa original comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 1. En otra realización, la alfa-amilasa original es una variante alélica del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1.

La alfa-amilasa original puede ser también un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos 80 % con el polipéptido expuesto en la Id. de sec. n.º: 2.

En un aspecto, la alfa-amilasa original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la Id. de sec. n.º: 2 de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, *p. ej.*, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 o 100 %, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original difiere en no más de diez aminoácidos, *p. ej.*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 2.

La alfa-amilasa original comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 2. En otra realización, la alfa-amilasa original es una variante alélica del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 2.

La alfa-amilasa original puede ser también un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos 80 % con el polipéptido expuesto en la Id. de sec. n.º: 3.

En un aspecto, la alfa-amilasa original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la Id. de sec. n.º: 3 de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, *p. ej.*, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 o 100 %, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original difiere en no más de diez aminoácidos, *p. ej.*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 3.

La alfa-amilasa original comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 3. En otra realización, la alfa-amilasa original es una variante alélica del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 3.

- 5 La alfa-amilasa original puede ser también un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos 80 % con el polipéptido expuesto en la Id. de sec. n.º: 4.

10 En un aspecto, la alfa-amilasa original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la Id. de sec. n.º: 4 de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, *p. ej.*, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 o 100 %, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original difiere en no más de diez aminoácidos, *p. ej.*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 4.

- 15 La alfa-amilasa original comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 4. En otra realización, la alfa-amilasa original es una variante alélica del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 4.

La alfa-amilasa original puede ser también un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos 80 % con el polipéptido expuesto en la Id. de sec. n.º: 5.

20 En un aspecto, la alfa-amilasa original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la Id. de sec. n.º: 5 de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, *p. ej.*, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 o 100 %, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original difiere en no más de diez aminoácidos, *p. ej.*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 5.

La alfa-amilasa original comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 5. En otra realización, la alfa-amilasa original es una variante alélica del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 5.

30 La alfa-amilasa original puede ser también un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos 80 % con el polipéptido expuesto en la Id. de sec. n.º: 6.

35 En un aspecto, la alfa-amilasa original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la Id. de sec. n.º: 6 de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, *p. ej.*, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 o 100 %, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original difiere en no más de diez aminoácidos, *p. ej.*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 6.

40 La alfa-amilasa original comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 6. En otra realización, la alfa-amilasa original es una variante alélica del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 6.

La alfa-amilasa original puede ser también un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos 80 % con el polipéptido expuesto en la Id. de sec. n.º: 7.

45 En un aspecto, la alfa-amilasa original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la Id. de sec. n.º: 7 de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, *p. ej.*, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 o 100 %, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original difiere en no más de diez aminoácidos, *p. ej.*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 7.

50 La alfa-amilasa original comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 7. En otra realización, la alfa-amilasa original es una variante alélica del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 7.

La alfa-amilasa original puede ser también un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos 80 % con el polipéptido expuesto en la Id. de sec. n.º: 8.

60 En un aspecto, la alfa-amilasa original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la Id. de sec. n.º: 8 de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, *p. ej.*, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 o 100 %, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original difiere en no más de diez aminoácidos, *p. ej.*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 8.

65

La alfa-amilasa original comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 8. En otra realización, la alfa-amilasa original es una variante alélica del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 8.

La secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º: 1, Id. de sec. n.º: 2, Id. de sec. n.º: 3, Id. de sec. n.º: 4, Id. de sec. n.º: 5, Id. de sec. n.º: 6, Id. de sec. n.º: 7, Id. de sec. n.º: 8, o un fragmento de la misma, puede utilizarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica un progenitor de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, dichas sondas se pueden utilizar para hibridar con ADN genómico o ADNc del género o especie de interés, según los procedimientos de transferencia Southern normalizados, para identificar y aislar el gen correspondiente del anterior. Dichas sondas pueden ser notablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben tener al menos 14, *p. ej.*, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene al menos 100 nucleótidos de longitud, *p. ej.*, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 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.

Una genoteca de ADN genómico o ADNc preparada a partir de otros organismos de este tipo puede cribarse para detectar ADN que se hibride con las sondas descritas anteriormente y que codifique un precursor. El ADN genómico o ADNc procedente de otros organismos de este tipo se puede separar mediante electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizarse sobre nitrocelulosa u otro material de soporte adecuado que se utilice en una transferencia Southern.

Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda de nucleótidos marcada correspondiente a un polinucleótido que codifica la Id. de sec. n.º: 1, Id. de sec. n.º: 2, Id. de sec. n.º: 3, Id. de sec. n.º: 4, Id. de sec. n.º: 5, Id. de sec. n.º: 6, Id. de sec. n.º: 7, Id. de sec. n.º: 8 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.

En un aspecto, la sonda de ácido nucleico es un polinucleótido que codifica el polipéptido de Id. de sec. n.º: 1, Id. de sec. n.º: 2, Id. de sec. n.º: 3, Id. de sec. n.º: 4, Id. de sec. n.º: 5, Id. de sec. n.º: 6, Id. de sec. n.º: 7, Id. de sec. n.º: 8, o un fragmento de la misma.

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 Southern blot durante un período de 12 a 24 horas, de forma óptima. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una de ellas durante 15 minutos utilizando 2X SSC, SDS al 0,2 % SDS a 45 °C (rigurosidad muy baja), 50 °C (rigurosidad baja), 55 °C (rigurosidad media), 60 °C (rigurosidad media-alta), 65 °C (rigurosidad alta), o 70 °C (rigurosidad muy alta).

Para sondas cortas que tienen de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de rigurosidad se definen como prehibridación e hibridación a de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 10 °C por debajo de la T_m calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 1390) en NaCl 0,9 M, Tris-HCl 0,09 M pH 7,6, EDTA 6 mM, NP-40 al 0,5 %, 1X solución de Denhardt, pirofosfato de sodio 1 mM, fosfato de sodio monobásico 1 mM, ATP 0,1 mM, y 0,2 mg de ARN de levadura por ml, seguido por los procedimientos convencionales de transferencia Southern durante de 12 a 24 horas, óptimamente. El material portador finalmente se lava una vez en 6X SSC más SDS al 0,1 % durante 15 minutos y dos veces, cada una durante 15 minutos utilizando 6X SSC a de 5 °C a 10 °C por debajo de la T_m calculada.

El precursor se puede obtener a partir de un microorganismo de cualquier género. Para los fines de la presente invención, la expresión "obtenido a partir de" como se usa en la presente memoria con respecto a una fuente dada debe significar que el precursor codificado mediante un polinucleótido se produce mediante la fuente o mediante una célula en la que se ha introducido la fuente. En un aspecto, el precursor se secreta extracelularmente.

El precursor puede ser una alfa-amilasa bacteriana. Por ejemplo, el precursor puede ser un polipéptido de una bacteria gram-positiva tal como una alfa-amilasa de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Streptomyces*, o un polipéptido de una bacteria gram negativa tal como una alfa-amilasa de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma*.

En un aspecto, el precursor es una alfa-amilasa de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.

En otro aspecto, el precursor es una alfa-amilasa de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* o *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

5 En otro aspecto, el precursor es una alfa-amilasa de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* o *Streptomyces lividans*.

En otro aspecto, el progenitor es una alfa-amilasa de *Bacillus sp.*, *p. ej.*, la alfa-amilasa de Id. de sec. n.º: 1, Id. de sec. n.º: 2, Id. de sec. n.º: 3, Id. de sec. n.º: 4, Id. de sec. n.º: 5, Id. de sec. n.º: 6, Id. de sec. n.º: 7 o Id. de sec. n.º: 8.

10 Se entenderá que, para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados tanto perfectos como imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, *p. ej.*, anamorfos, independientemente del nombre por el que se conoce la especie. El experto en la técnica reconocerá fácilmente la identidad de los equivalentes adecuados.

15 Las cepas de dichas especies están fácilmente accesibles para el público en numerosas colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRRL).

20 El precursor puede identificarse y obtenerse de otras fuentes, incluidos microorganismos aislados de la naturaleza (*p. ej.*, suelo, compost, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (*p. ej.*, suelo, compost, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales son bien conocidos en la técnica. El polinucleótido que codifica un precursor se puede derivar a continuación mediante cribado análogo de una genoteca de ADN genómico o ADNc o de otro microorganismo o de una muestra de ADN mixto. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica un precursor con una sonda o sondas, el polinucleótido puede aislarse o clonarse utilizando técnicas conocidas por el experto en la técnica (véase, *p. ej.*, Sambrook y col., 1989, anteriormente).

25 El precursor puede ser un polipéptido híbrido en el que una parte de un polipéptido está fusionado en el extremo N o el extremo C de una parte de otro polipéptido.

30 El precursor puede ser también un polipéptido fusionado o polipéptido de fusión escindible en el que un polipéptido está fusionado en el extremo N o el extremo C de otro polipéptido. Un polipéptido fusionado se produce fusionando un polinucleótido que codifica un polipéptido con un polinucleótido que codifica otro polipéptido. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica, e incluyen la unión de las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de tal forma que estén en marco, y la expresión del polipéptido fusionado está bajo el control del mismo promotor(es) y terminador. Las proteínas de fusión también pueden construirse utilizando tecnología de inteínas en la que las fusiones se crean después de la traducción (Cooper y col., 1993, *EMBO J.* 12: 2575-2583; Dawson y col., 1994, *Science* 266: 776-779).

40 Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, aunque no de forma limitativa, los sitios descritos en Martin y col., 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3: 568-576; Svetina y col., 2000, *J. Biotechnol.* 76: 245-251; Rasmussen-Wilson y col., 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3488-3493; Ward y col., 1995, *Biotechnology* 13: 498-503; y Contreras y col., 1991, *Biotechnology* 9: 378-381; Eaton y col., 1986, *Biochemistry* 25: 505-512; Collins-Racie y col., 1995, *Biotechnology* 13: 982-987; Carter y col., 1989, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 6: 240-248; y Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48.

Preparación de variantes

50 (a) Un método adecuado para obtener una variante esencial para la presente invención que tiene actividad alfa-amilasa, comprende (a) introducir en una alfa-amilasa original una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304 y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada modificación es independientemente una sustitución o delección, y dicha variante tiene actividad alfa-amilasa; y (iv) la variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:

X1*+X109A+X280S+X391A;

60 X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;

65 X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;

- X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
- 5 X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
- 10 X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
- 15 X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X391V;
- 20 X1*+X109A+X284R+X391A;
- X1*+X109A+X284F+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
- 25 X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
- 30 X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
- X1*+X109S+X280S+X391A;
- X1*+X109A+X284H+X391A;
- 35 X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
- 40 X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
- X7A+X284H+X320A+X323N;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
- 45 X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
- 50 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
- 55 X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
- 60 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A y
- 65 (b) recuperar dicha variante.

(a) En un aspecto, el método para obtener una variante que tiene actividad alfa-amilasa, comprende (a) introducir en una alfa-amilasa original una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304 y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en las Id. de sec. n.º: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde cada modificación es independientemente una sustitución o delección, y dicha variante tiene actividad alfa-amilasa; y (iv) la variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:

X1*+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X391V;

X1*+X109A+X284R+X391A;

X1*+X109A+X284F+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;

X1*+X109S+X280S+X391A;

X1*+X109A+X284H+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;

X7A+X284H+X320A+X323N;

X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;

5 X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;

10 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

15 X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A y

y (b) recuperar dicha variante.

20 En una realización, la modificación es una sustitución. En una realización, la modificación es una delección.

En otra realización, el método para obtener una variante que tiene actividad alfa-amilasa, comprende (a) introducir en una alfa-amilasa original una sustitución en una o más posiciones, en donde la sustitución se selecciona de H1A, G7A, G109A, N280S, W284H, K320A, M323N y E391A del polipéptido de las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y (b) recuperar la variante.

El método puede comprender además introducir en la alfa-amilasa original una delección en una o más posiciones, en donde la delección se selecciona de: H1*, R181*, G182*, D183* y G184* del polipéptido de las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y recuperar la variante.

El método puede comprender además introducir en la alfa-amilasa original una sustitución en una o más posiciones, en donde la sustitución se selecciona de: W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G, G304R y G476K del polipéptido de las Id. de sec. n.º: 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y recuperar la variante.

Las variantes pueden prepararse utilizando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio, construcción de genes sintéticos, construcción de genes semisintéticos, mutagénesis aleatoria, intercambio, etc.

La mutagénesis dirigida al sitio es una técnica en la que se crean una o más (varias) mutaciones en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el precursor.

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 en casete que implica la escisión mediante una enzima de restricción en un sitio del plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el precursor 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. Véanse, p. ej., Scherer y Davis, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4949-4955; y Barton y col., 1990, *Nucleic Acids Res.* 18: 7349-4966.

La mutagénesis dirigida al sitio también se puede llevar a cabo *in vivo* por métodos conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., la solicitud de patente con número de publicación US-2004/0171154; Storici y col., 2001, *Nature Biotechnol.* 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 usar para preparar variantes.

La construcción de genes sintéticos conlleva la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis de genes se puede llevar a cabo utilizando numerosas técnicas, tal como la tecnología multiplexada en chip descrita en Tian y col. (2004, *Nature* 432: 1050-1054) y tecnologías similares en donde los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan sobre chips microfluidos fotoprogramables.

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 descrito 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 usar incluyen la técnica de PCR

propensa a error, expresión en fago (p. ej., Lowman y col., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; US-5.223.409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire y col., 1986, *Gene* 46: 145; Ner y col., 1988, *DNA* 7: 127).

5 Los métodos de mutagénesis/intercambio se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de cribado automatizado para detectar la actividad de los polipéptidos mutagenizados clonados expresados en células huésped (Ness y col., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huéspedes y secuenciadas rápidamente utilizando métodos convencionales en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de los restos del aminoácido individuales en un polipéptido.

10 La construcción de genes semisintéticos 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 intercambio. 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, 15 mientras que otras regiones adicionales se pueden someter a amplificación mediante PCR propensa a error o PCR no propensa a error. A continuación, las subsecuencias de polinucleótido se pueden intercambiar.

Variantes

20 Las variantes de una alfa-amilasa original esencial para la presente invención pueden comprender (i) una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304, y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1, (ii) la 25 variante tiene al menos 80, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y

(iii) la variante tiene actividad alfa-amilasa y (iv) la variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:

30 X1*+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;

35 X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;

40 X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;

45 X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;

50 X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;

55 X1*+X109A+X280S+X391V;

X1*+X109A+X284R+X391A;

60 X1*+X109A+X284F+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;

65 X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;

- X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
- 5 X1*+X109S+X280S+X391A;
- X1*+X109A+X284H+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
- 10 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
- X7A+X284H+X320A+X323N;
- 15 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
- 20 X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
- 25 X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
- 30 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
- 35 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A. De este modo, se proporcionan variantes que tienen una capacidad limpiadora mejorada a baja temperatura, en comparación con la alfa-amilasa original o en comparación con la alfa-amilasa de Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.
- 40 Las variantes adecuadas pueden tener una identidad de secuencia de al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menos de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original.
- (a) Las variantes aisladas de una alfa-amilasa original adecuada en la presente memoria pueden comprender (i)
- 45 una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304, y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1, (ii) la variante tiene al menos 80, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y (iii) la variante tiene actividad alfa-amilasa y (iv) la variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- 50 X1*+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
- 55 X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
- 60 X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
- 65 X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;

- X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
5 X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
10 X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X391V;
15 X1*+X109A+X284R+X391A;
X1*+X109A+X284F+X391A;
20 X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
25 X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
X1*+X109S+X280S+X391A;
X1*+X109A+X284H+X391A;
30 X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
35 X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
X7A+X284H+X320A+X323N;
40 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
45 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
50 X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
55 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
60 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A y
Las variantes adecuadas pueden tener al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, y al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, y al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 2.

5 En otra realización, una variante adecuada tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, y al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 3.

10 En otra realización, una variante adecuada tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, y al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 4.

15 En otra realización, una variante adecuada tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, y al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 5.

20 En otra realización, una variante adecuada tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, y al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 6.

En otra realización, una variante adecuada tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, y al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 7.

25 En otra realización, una variante adecuada tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, y al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la Id. de sec. n.º: 8.

30 En una realización, el número de modificaciones en una variante adecuada para su uso en la presente invención es de 1 a 20, *p. ej.*, de 1 a 10 y de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones.

35 En una realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y opcionalmente una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

40 En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y opcionalmente una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

45 En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en tres o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y opcionalmente una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

50 En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en cuatro o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y opcionalmente una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

55 En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en cinco o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y opcionalmente una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

60 En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en seis o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y opcionalmente una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

65 En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en siete o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y opcionalmente una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en ocho posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y opcionalmente una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En una realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en tres o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en cuatro o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en cinco o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en seis o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en siete o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En otra realización, una variante adecuada comprende una modificación, tal como una sustitución, en ocho posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391, y una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 203, 243, 260, 304 y 476, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En una realización preferida, la variante comprende una modificación en una, dos, tres, cuatro o cinco posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 1, 7, 109, 280 y 391. En una realización, la variante comprende al menos una delección y al menos una sustitución en dos, tres, cuatro o cinco posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 1, 7, 109, 280 y 391.

En una realización, una variante adecuada comprende una sustitución en una, dos, tres o cuatro posiciones seleccionadas de 7, 109, 280 y 391.

En una realización, una variante adecuada comprende modificaciones en las posiciones seleccionadas del grupo de posiciones que consisten en: X1+X7; X1+X109; X1+X280; X1+X284; X1+X320; X1+X323; X1+X391; X109+X280; X109+X284; X109+X320; X109+X323; X109+X391; X7+X109; X7+X280; X7+X284; X7+X323; X7+X391; X280+X284; X280+X320; X280+X323; X280+X391; X284+X320; X284+X323; X284+X391; X320+X323; X320+X391; y X323+X391, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

En una realización, una variante adecuada comprende modificaciones en las posiciones seleccionadas del grupo de posiciones que consisten en: X109+X7+X1; X109+X7+X391; X109+X7+X280; X109+X7+X284; X109+X7+X320; X109+X7+X323; X109+X1+X391; X109+X1+X280; X109+X1+X284; X109+X1+X320; X109+X1+X323; X109+X391+X280; X109+X391+X284; X109+X391+X320; X109+X391+X323; X109+X280+X284; X109+X280+X320; X109+X280+X323; X109+X284+X320; X109+X284+X323; X109+X320+X323; X7+X1+X391; X7+X1+X280; X7+X1+X284; X7+X1+X320; X7+X1+X323; X7+X391+X280; X7+X391+X284; X7+X391+X320; X7+X391+X323; X7+X280+X284; X7+X280+X320; X7+X280+X323; X7+X284+X320; X7+X284+X323; X1+X391+X280; X1+X391+X284; X1+X391+X320; X1+X391+X323;

X1+X280+X284; X1+X280+X320; X1+X280+X323; X1+X284+X320; X1+X284+X323; X1+X320+X323; X391+X280+X284; X391+X280+X320; X391+X280+X323; X391+X284+X320; X391+X284+X323; X391+X320+X323; X280+X284+X320; X280+X284+X323; X280+X320+X323; y X284+X320+X323, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

- 5 En una realización, una variante adecuada comprende modificaciones en las posiciones seleccionadas del grupo de posiciones que consisten en: X109+X7+X1+X391; X109+X7+X1+X280; X109+X7+X1+X284; X109+X7+X1+X320; X109+X7+X1+X323; X109+X7+X391+X280; X109+X7+X391+X284; X109+X7+X391+X320; X109+X7+X391+X323; X109+X7+X280+X284; X109+X7+X280+X320; X109+X7+X280+X323; X109+X7+X284+X320; X109+X7+X284+X323; X109+X7+X320+X323; X109+X1+X391+X280; X109+X1+X391+X284; X109+X1+X391+X320; X109+X1+X391+X323; X109+X1+X280+X284; X109+X1+X280+X320; X109+X1+X280+X323; X109+X1+X284+X320; X109+X1+X284+X323; X109+X1+X320+X323; X109+X391+X280+X284; X109+X391+X280+X320; X109+X391+X280+X323; X109+X391+X284+X320; X109+X391+X284+X323; X109+X391+X320+X323; X109+X280+X284+X320; X109+X280+X284+X323; X109+X280+X320+X323; X109+X284+X320+X323; X7+X1+X391+X280; X7+X1+X391+X284; X7+X1+X391+X320; X7+X1+X391+X323; X7+X1+X280+X284; X7+X1+X280+X320; X7+X1+X280+X323; X7+X1+X284+X320; X7+X1+X284+X323; X7+X1+X320+X323; X7+X391+X280+X284; X7+X391+X280+X320; X7+X391+X280+X323; X7+X391+X284+X320; X7+X391+X284+X323; X7+X391+X320+X323; X7+X280+X284+X320; X7+X280+X284+X323; X7+X280+X320+X323; X7+X284+X320+X323; X1+X391+X280+X284; X1+X391+X280+X320; X1+X391+X280+X323; X1+X391+X284+X320; X1+X391+X284+X323; X1+X391+X320+X323; X1+X280+X284+X320; X1+X280+X284+X323; X1+X280+X320+X323; X1+X284+X320+X323; X391+X280+X284+X320; X391+X280+X284+X323; X391+X280+X320+X323; X391+X284+X320+X323; y X280+X284+X320+X323, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.
- 10
- 15
- 20

- 25 En una realización, una variante adecuada comprende una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en X1*, X1A, X7A, X7K, X7E, X7N, X7Q, X7L, X7D, X109A, X109S, X140Y, X181*, X182*, X183*, X184*, X195F, X206Y, X243F, X260G, X280S, X284H, X284R, X284F, X304R, X320A, X320M, X320T, X320V, X320S, X323N, X323R, X323S, X323K, X391A, X391V y X476K, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.

- 30 En una realización particular, una variante adecuada comprende las modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en: X1*+X1A; X1*+X7A; X1*+X109A; X1*+X280S; X1*+X284H; X1*+X320A; X1*+X323N; X1*+X391A; X1A+X7A; X1A+X109A; X1A+X280S; X1A+X284H; X1A+X320A; X1A+X323N; X1A+X391A; X7A+X109A; X7A+X280S; X7A+X284H; X7A+X323N; X7A+X391A; X109A+X280S; X109A+X284H; X109A+X320A; X109A+X323N; X109A+X391A; X280S+X284H; X280S+X320A; X280S+X323N; X280S+X391A; X284H+X320A; X284H+X323N; X284H+X391A; X320A+X323N; X320A+X391A; y X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.
- 35

- En una realización, una variante adecuada comprende las modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en: X1*+X7A+X109A; X1*+X7A+X280S; X1*+X7A+X284H; X1*+X7A+X320A; X1*+X7A+X323N; X1*+X7A+X391A; X1*+X109A+X280S; X1*+X109A+X284H; X1*+X109A+X320A; X1*+X109A+X323N; X1*+X109A+X391A; X1*+X280S+X284H; X1*+X280S+X320A; X1*+X280S+X323N; X1*+X280S+X391A; X1*+X284H+X320A; X1*+X284H+X323N; X1*+X284H+X391A; X1*+X320A+X323N; X1*+X320A+X391A; X1*+X323N+X391A; X1A+X7A+X109A; X1A+X7A+X280S; X1A+X7A+X284H; X1A+X7A+X320A; X1A+X7A+X323N; X1A+X7A+X391A; X1A+X109A+X280S; X1A+X109A+X284H; X1A+X109A+X320A; X1A+X109A+X323N; X1A+X109A+X391A; X1A+X280S+X284H; X1A+X280S+X320A; X1A+X280S+X323N; X1A+X280S+X391A; X1A+X284H+X320A; X1A+X284H+X323N; X1A+X284H+X391A; X1A+X320A+X323N; X1A+X320A+X391A; X1A+X323N+X391A; X7A+X109A+X280S; X7A+X109A+X284H; X7A+X109A+X320A; X7A+X109A+X323N; X7A+X109A+X391A; X7A+X280S+X284H; X7A+X280S+X320A; X7A+X280S+X323N; X7A+X280S+X391A; X7A+X284H+X320A; X7A+X284H+X323N; X7A+X284H+X391A; X7A+X320A+X391A; X7A+X323N+X391A; X109A+X280S+X284H; X109A+X280S+X320A; X109A+X280S+X323N; X109A+X280S+X391A; X109A+X284H+X320A; X109A+X284H+X323N; X109A+X284H+X391A; X109A+X320A+X323N; X109A+X320A+X391A; X109A+X323N+X391A; X280S+X284H+X320A; X280S+X284H+X323N; X280S+X284H+X391A; X280S+X320A+X323N; X280S+X320A+X391A; X280S+X323N+X391A; X284H+X320A+X323N; X284H+X320A+X391A; X284H+X323N+X391A; y X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.
- 40
- 45
- 50

- La variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- 55

X1*+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;

- 60 X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;

- 65 X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;

- X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
5 X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
10 X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
15 X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X391V;
20 X1*+X109A+X284R+X391A;
X1*+X109A+X284F+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
25 X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
30 X1*+X109S+X280S+X391A;
X1*+X109A+X284H+X391A;
35 X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
40 X7A+X284H+X320A+X323N;
X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
45 X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
50 X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
55 X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
60 X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de las amilasas expuestas en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.
65

Una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 X1*+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
- 10 X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
- 15 X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
- 20 X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
- 25 X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
- 30 X1*+X109A+X280S+X391V;
X1*+X109A+X284R+X391A;
X1*+X109A+X284F+X391A;
- 35 X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
- 40 X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
X1*+X109S+X280S+X391A;
- 45 X1*+X109A+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
- 50 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
X7A+X284H+X320A+X323N;
- 55 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
- 60 X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
- 65 X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;

- X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
- 5 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
- 10 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las amilasas expuestas en la Id. de sec. n.º: 1.
- Una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 2, seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 X1*+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
- 20 X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
- 25 X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
- 30 X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
- 35 X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
- 40 X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X391V;
- X1*+X109A+X284R+X391A;
- 45 X1*+X109A+X284F+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
- 50 X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
- 55 X1*+X109S+X280S+X391A;
- X1*+X109A+X284H+X391A;
- 60 X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
- 65 X7A+X284H+X320A+X323N;

- X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
- 5 X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
- 10 X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
- 15 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
- 20 X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las amilasas expuestas en la Id. de sec. n.º: 2.
- 25 Una variante preferida comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 2, seleccionada del grupo que consiste en:
- H1*+G109A+N280S+E391A;
- 30 H1*+G7K+G109A+N280S+E391A;
- H1*+G7E+G109A+N280S+E391A;
- H1*+G7N+G109A+N280S+E391A;
- 35 H1*+G7Q+G109A+N280S+E391A;
- H1*+G7L+G109A+N280S+E391A;
- 40 H1*+G7D+G109A+N280S+E391A;
- H1*+G109A+N280S+K320A+E391A;
- H1*+G109A+N280S+K320M+E391A;
- 45 H1*+G109A+N280S+K320T+E391A;
- H1*+G109A+N280S+K320V+E391A;
- 50 H1*+G109A+N280S+M323R+E391A;
- H1*+G109A+N280S+K320S+E391A;
- H1*+G109A+N280S+E391V;
- 55 H1*+G109A+W284R+E391A;
- H1*+G109A+W284F+E391A;
- 60 H1*+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A;
- H1*+G109A+N280S+W284F+E391A;
- H1*+G109A+N280S+M323N+E391A;
- 65 H1*+G109A+N280S+M323K+E391A;

- H1*+G109S+N280S+E391A;
- 5 H1*+G109A+W284H+E391A;
- H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A;
- H1*+G7A+G109A+N280S+E391A;
- 10 H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+K320A+M323N+E391A;
- G7A+W284H+K320A+M323N;
- H1*+G7A+G109A+N280S+E391A;
- 15 H1*+G109A+N280S+W284H+E391A;
- H1*+G109A+N280S+M323S+E391A;
- 20 H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+E391A;
- H1*+G7A+G109A+N280S+M323S+E391A;
- H1*+G7A+G109A+N280S+M323N+E391A;
- 25 H1*+G7A+G109A+N280S+W284F+E391A;
- H1*+G7A+G109A+N280S+W284R+E391A;
- 30 H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A;
- H1*+G7A+G109A+W284R+E391A; y
- H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A.
- 35 Una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 3, seleccionada del grupo que consiste en:
- X1*+X109A+X280S+X391A;
- 40 X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
- 45 X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
- 50 X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
- 55 X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
- 60 X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
- 65 X1*+X109A+X280S+X391V;

- X1*+X109A+X284R+X391A;
X1*+X109A+X284F+X391A;
5 X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
10 X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
X1*+X109S+X280S+X391A;
15 X1*+X109A+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
20 X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
X7A+X284H+X320A+X323N;
25 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
30 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
35 X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
40 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
45 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las amilasas expuestas en la Id. de sec. n.º: 3.
- Una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 4, seleccionada del grupo que consiste en:
- 50 X1*+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
55 X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
60 X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
65 X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;

- X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
5 X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
10 X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X391V;
X1*+X109A+X284R+X391A;
15 X1*+X109A+X284F+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
20 X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
25 X1*+X109S+X280S+X391A;
X1*+X109A+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
30 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
35 X7A+X284H+X320A+X323N;
X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
40 X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
45 X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
50 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
55 X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las amilasas expuestas en la Id. de sec. n.º: 4.
60 Una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 5, seleccionada del grupo que consiste en:
X1*+X109A+X280S+X391A;
65 X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
 5 X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
 10 X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
 15 X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
 20 X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X391V;
 25 X1*+X109A+X284R+X391A;
 X1*+X109A+X284F+X391A;
 30 X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
 35 X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
 X1*+X109S+X280S+X391A;
 40 X1*+X109A+X284H+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
 45 X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
 X7A+X284H+X320A+X323N;
 50 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
 55 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
 60 X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
 65 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y

X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las amilasas expuestas en la Id. de sec. n.º: 5.

5 Una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 6, seleccionada del grupo que consiste en:

X1*+X109A+X280S+X391A;

10 X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;

15 X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;

20 X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;

25 X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;

30 X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;

35 X1*+X109A+X280S+X391V;

X1*+X109A+X284R+X391A;

X1*+X109A+X284F+X391A;

40 X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;

45 X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;

X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;

X1*+X109S+X280S+X391A;

50 X1*+X109A+X284H+X391A;

X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;

55 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;

X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;

X7A+X284H+X320A+X323N;

60 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;

X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;

65 X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;

- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
5 X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
10 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
15 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las amilasas expuestas en la Id. de sec. n.º: 6.
- Una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 7, seleccionada del grupo que consiste en:
- 20 X1*+X109A+X280S+X391A;
-
- X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
-
- 25 X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
-
- X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
-
- X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
-
- 30 X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
-
- X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
-
- 35 X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
-
- X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
-
- X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
-
- 40 X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
-
- X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
-
- 45 X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
-
- X1*+X109A+X280S+X391V;
-
- X1*+X109A+X284R+X391A;
-
- 50 X1*+X109A+X284F+X391A;
-
- X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
-
- 55 X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
-
- X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
-
- X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
-
- 60 X1*+X109S+X280S+X391A;
-
- X1*+X109A+X284H+X391A;
-
- 65 X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;

- X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
- 5 X7A+X284H+X320A+X323N;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
- 10 X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
- 15 X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
- 20 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
- 25 X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
- X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las amilasas expuestas en la Id. de sec. n.º: 7.
- 30 Una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 8, seleccionada del grupo que consiste en:
- X1*+X109A+X280S+X391A;
- 35 X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
- 40 X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
- 45 X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
- 50 X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
- 55 X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
- X1*+X109A+X280S+X391V;
- 60 X1*+X109A+X284R+X391A;
- X1*+X109A+X284F+X391A;
- 65 X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;

- X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
5 X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
X1*+X109S+X280S+X391A;
10 X1*+X109A+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
15 X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
X7A+X284H+X320A+X323N;
X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
20 X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
25 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
30 X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
35 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
40 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1 y la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las amilasas expuestas en la Id. de sec. n.º: 8.
Se prefiere que la variante comprenda una modificación en una, dos, tres, cuatro o cinco posiciones seleccionadas del grupo de X1*, X1A, X7A, X109A, X280S y X391A. En una realización más preferida, las modificaciones en una, dos, tres, cuatro o cinco posiciones se seleccionan de X1*, X7A, X109A, X280S y X391A.
45 En un aspecto, una variante adecuada puede comprender modificaciones en las posiciones correspondientes a
X1*+X109A+X280S+X391A,
50 X1*+X109A+X284H+X391A,
X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A,
X1*+X7A+X109A+X280S+X391A, y
55 X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X323N+X391A,
en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.
60 Una variante adecuada puede comprender variantes de Id. de sec. n.º: 1 que comprenden modificaciones en las posiciones correspondientes a
H1*+G109A+N280S+E391A; H1*+G109A+W284H+E391A;
H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y
H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A,
65

en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 1.

- 5 Una variante adecuada puede comprender una variante de la Id. de sec. n.º: 2 que comprende modificaciones correspondientes a H1*+G109A+N280S+E391A; H1*+G109A+W284H+E391A; H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 2.
- 10 En una realización, la invención se refiere a variantes de Id. de sec. n.º: 3 que comprenden modificaciones correspondientes a H1*+G109A+N280S+E391A; H1*+G109A+W284H+E391A; H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 3.
- 15 En una realización, la invención se refiere a variantes de Id. de sec. n.º: 4 que comprenden modificaciones correspondientes a H1*+G109A+N280S+E391A; H1*+G109A+W284H+E391A; H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 4.
- 20 En una realización, la invención se refiere a variantes de Id. de sec. n.º: 5 que comprenden modificaciones correspondientes a H1*+G109A+N280S+E391A; H1*+G109A+W284H+E391A; H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 5.
- 25 En una realización, la invención se refiere a variantes de Id. de sec. n.º: 6 que comprenden modificaciones correspondientes a H1*+G109A+N280S+E391A; H1*+G109A+W284H+E391A; H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 6.
- 30 En una realización, la invención se refiere a variantes de Id. de sec. n.º: 7 que comprenden modificaciones correspondientes a H1*+G109A+N280S+E391A; H1*+G109A+W284H+E391A; H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 7.
- 35 En una realización, las variantes pueden comprender variantes de Id. de sec. n.º: 8 que comprenden modificaciones correspondientes a H1*+G109A+N280S+E391A; H1*+G109A+W284H+E391A; H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, y en donde la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 8.
- 40 En una realización, la variante para la invención comprende además una modificación en una o más posiciones seleccionadas del grupo de 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304 y 476. En una realización particular, la variante para la invención comprende una o más modificaciones adicionales seleccionadas del grupo de W140Y/F, R181*, G182*, D183*, G184*, N195F/Y, I206Y/F, Y243F, E260A/D/C/Q/L/M/F/P/S/W/V/G/H/I/K/N/R/T/Y, G304R/K/E/Q y G476E/Q/R/K. La
- 45 la variante para la invención puede comprender además sustituciones en dos, tres o cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304R, W140YF, E260GHIKNPRTY y G476EQRK. En una realización más preferida, las sustituciones en las dos, tres o cuatro posiciones se seleccionan del grupo que consiste en G304R, W140Y, E260G y G476K.
- La variante para la invención puede comprender las modificaciones correspondientes a
- 50 H1*+G109A+W140Y+D183*+G184*+N195F+I206Y+Y243F+E260G+N280S+G304R+E391A+G476K,
H1*+G109A+W140Y+D183*+G184*+N195F+I206Y+Y243F+E260G+W284H+G304R+E391A+G476K,
- 55 H1*+G109A+W140Y+D183*+G184*+N195F+I206Y+Y243F+E260G+N280S+G304R+K320A+M323N+E391A+G476K,
H1*+G7A+G109A+W140Y+D183*+G184*+N195F+I206Y+Y243F+E260G+N280S+G304R+E391A+G476K, y
H1*+G7A+G109A+W140Y+D183*+G184*+N195F+I206Y+Y243F+E260G+N280S+W284H+G304R+M323N+E391A+G476K,
- 60 en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1, la variante tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y es una variante de la Id. de sec. n.º: 1
- 65 Los aminoácidos esenciales de un precursor pueden identificarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de detección de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science*

244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de una única alanina en cada resto de la molécula y las moléculas mutadas resultantes se evalúan para determinar su actividad con el fin de identificar los restos de aminoácidos que son cruciales para la actividad alfa-amilasa de la molécula. Véase también, Hilton y col., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la alfa-amilasa u otra interacción biológica también puede ser determinado mediante análisis de la estructura física mediante técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o etiquetado de fotoafinidad, junto con la mutación de nuevos sitios de contacto de aminoácidos. Véanse, por ejemplo, Vos y col., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith y col., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver y col., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. Las identidades de los aminoácidos esenciales también se pueden inferir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con el precursor.

Constructo de ácido nucleico

Los constructos de ácido nucleico pueden comprender un polinucleótido que codifica una variante esencial para la presente invención unida operativamente a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control. Un polinucleótido puede manipularse de diversas maneras para proporcionar la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

La secuencia de control puede ser una secuencia promotora, que es reconocida por una célula huésped para la expresión del polinucleótido. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcional que median la expresión de la variante. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que muestre actividad transcripcional en la célula huésped incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares homólogos o heterólogos en la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos a partir del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), el gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), el gen de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (sacB), los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, el gen de la agarasa del operón lac de *E. coli* de *Streptomyces coelicolor* (dagA), y el gen de la beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff y col., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer y col., 1983, *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert y col., 1980, *Scientific American* 242: 74-94; y en Sambrook y col., 1989, más arriba.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped de hongo filamentoso son los promotores obtenidos a partir de los genes de la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa (glaA) de *Aspergillus awamori*, la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), la amiloglucosidasa de *Fusarium venetatum* (WO 00/56900), *Fusarium venetatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venetatum* Quinn (WO 00/56900), la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, la xilanasa I de *Trichoderma reesei*, la xilanasa II de *Trichoderma reesei*, la beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en *Aspergilli* en el que el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados que incluyen el gen que codifica la alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* en el que el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

En una levadura huésped, se obtienen promotores útiles a partir de los genes de la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la galactoquinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, la triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, la metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos y col., 1992, *Yeast* 8: 423-488.

La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de la transcripción adecuada, que es reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está unida operativamente al extremo 3' del polinucleótido que codifica la variante. Puede utilizarse cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped.

Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

5 Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos y col., 1992, *supra*.

10 La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para su traducción por parte de la célula huésped. La secuencia líder está unida operativamente al extremo 5' del polinucleótido que codifica la variante. Puede utilizarse cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped.

Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

20 Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia unida operativamente al extremo 3' de la secuencia que codifica la variante y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped.

25 Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, y la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

30 Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

La secuencia de control también puede ser una región codificadora del péptido señal que codifica un péptido señal unido al extremo N de una variante y dirige la variante a la ruta secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener inherentemente una región codificante del péptido señal unida naturalmente en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la región codificante que codifica la variante. De forma alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que es foránea a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal foránea puede ser necesaria cuando la secuencia codificante no contiene naturalmente una región codificante del péptido señal. De forma alternativa, la región codificante del péptido señal foránea puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante. Sin embargo, puede utilizarse cualquier región codificante del péptido señal que dirija la variante expresada hacia la ruta secretora de una célula huésped.

45 Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes de péptidos señal obtenidas de los genes de la amilasa maltogénica de *Bacillus* NCB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y prsA de *Bacillus subtilis*. Se describen péptidos señal adicionales se describen en Simonen y Palva, 1993, Microological Reviews 57: 109-137.

50 Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped de hongo filamentosos son las secuencias codificantes de péptidos señal obtenidas de los genes de la amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, la celulasa de *Humicola insolens*, la endoglucanasa V de *Humicola insolens*, la lipasa de *Humicola lanuginosa* y la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

55 Se obtienen péptidos señal útiles para células huésped de levadura de los genes del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptidos señal útiles se describen en Romanos y col., 1992, *supra*.

60 La secuencia de control también puede ser una región codificante de propéptido que codifica un propéptido situado en el extremo N de una variante. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido generalmente es inactivo y puede convertirse en un polipéptido activo mediante escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido puede obtenerse a partir de los genes de la proteasa alcalina (aprE) de *Bacillus subtilis*, la proteasa neutra (nprT) de *Bacillus subtilis*, la lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

65

Cuando las regiones tanto del péptido señal como del propéptido están presentes en el extremo N de una variante, la región del propéptido se coloca junto al extremo N de la variante y la región del péptido señal se coloca junto al extremo N de la región del propéptido.

También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de la variante con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que la expresión del gen se active o se desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procariotas incluyen los sistemas de operadores lac, tac y trp. En levaduras se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se puede utilizar el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten la amplificación génica. En los sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de la metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante estaría operativamente unido a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender un polinucleótido esencial para la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control pueden unirse entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica la variante en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse mediante la inserción del polinucleótido o constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector de manera que la secuencia codificante se une operativamente con secuencias de control adecuadas para expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (*p. ej.*, un plásmido o virus) que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se introducirá el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

El vector puede ser un vector que se replica de forma autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, *p. ej.*, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el uno o más cromosomas en los que se ha integrado. Además, puede usarse un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que conjuntamente contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

El vector comprende preferiblemente uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, fototrofia a los auxótrofos y similares.

Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina o tetraciclina. Entre los marcadores adecuados para células huésped de levadura se encuentran, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3.

El vector comprende preferiblemente uno o más elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica la variante o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. De forma alternativa, el vector puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una o más ubicaciones precisas en el cromosoma o cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, de 400 a 10.000 pares de bases y de 800 a 10.000 pares de bases, que tengan un alto grado de identidad con respecto a la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga de la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otra parte, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede también comprender un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador

plasmídico que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. La expresión “origen de replicación” o “replicador plasmídico” significa una secuencia de nucleótidos que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción de una variante. Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede obtenerse integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable en el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar mediante cultivo de las células en presencia del agente de selección adecuado.

Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por un experto en la técnica (véase, *p. ej.*, Sambrook y col., 1989, citado anteriormente) para obtener variantes sustancialmente puras.

Células huésped

Las células huésped recombinantes pueden comprender un polinucleótido esencial para la presente invención operativamente unido a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción de una variante para la presente invención. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de manera que el constructo o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. La expresión “célula huésped” abarca cualquier progenie de una célula precursora que no es idéntica a la célula precursora debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica la variante y su fuente.

La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, *p. ej.*, un procariota o eucariota.

La célula huésped procariota puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, aunque no de forma limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, aunque no de forma limitativa, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* que incluye, aunque no de forma limitativa, células de *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* que incluye, aunque no de forma limitativa, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equis sp Zooepidemicus*.

La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* que incluye, aunque no de forma limitativa, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede efectuarse, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Chang y Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115), el uso de células competentes (véase, *p. ej.*, Young y Spizizen, 1961, *J. Bacteriol.* 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *J. Mol. Biol.* 56: 209-221), electroporación (véase, *p. ej.*, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (véase, *p. ej.*, Koehler y Thorne, 1987, *J. Bacteriol.* 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede efectuarse, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) o electroporación (véase, *p. ej.*, Dower y col., 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede efectuarse, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos y electroporación (véase, *p. ej.*, Gong y col., 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), conjugación (véase, *p. ej.*, Mazodier y col., 1989, *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585) o transducción (véase, *p. ej.*, Burke y col., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede efectuarse, por ejemplo, por electroporación (véase, *p. ej.*, Choi y col., 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) o conjugación (véase, *p. ej.*, Pinedo y Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede efectuarse, por ejemplo, por competencia natural (véase, *p. ej.*, Perry y Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Catt y Jollick, 1991, *Microbios* 68: 189-2070), electroporación (véase, *p. ej.*, Buckley y col., 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804) o conjugación (véase, *p. ej.*, Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436). Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.

La célula huésped también puede ser eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, vegetal o fúngica.

Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238023, Yelton y col., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* se describen en Malardier y col., 1989, *Gene* 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura puede transformarse utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volumen 194, pág. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito y col., 1983, *J. Bacteriol.* 153: 163; y Hinnen y col., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1920.

Métodos de producción

El método para producir una variante puede comprender: (a) cultivar una célula huésped de la presente invención en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante. En consecuencia, la presente invención se refiere a métodos para producir una variante, que comprenden (a) cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión o una variante de codificación de polinucleótido que comprende una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304 y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1, en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.

Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse mediante cultivo en matraz de agitación, o fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluidas las fermentaciones continuas, discontinuas, semicontinuas o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales en un medio adecuado y en condiciones que permiten expresar y/o aislar el polipéptido. El cultivo se lleva a cabo en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden prepararse según composiciones publicadas (*p. ej.*, en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante se secreta en el medio nutriente, la variante puede recuperarse directamente del medio. Si la variante no se secreta, puede recuperarse de los lisados celulares.

La variante puede detectarse utilizando métodos conocidos en la técnica que sean específicos de las variantes. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo enzimático para determinar la actividad de la variante.

La variante puede recuperarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante puede recuperarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, aunque no de forma limitativa, recogida, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

La variante puede purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, aunque no de forma limitativa, cromatografía (*p. ej.*, intercambio iónico, afinidad, hidrófobo, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (*p. ej.*, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (*p. ej.*, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (véase, *p. ej.*, *Protein Purification*, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

En un aspecto alternativo, la variante no se recupera sino que, en su lugar, se utiliza como fuente de la variante una célula huésped de la presente invención que expresa una variante.

Las composiciones se pueden preparar según métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. La variante se puede estabilizar según métodos conocidos en la técnica.

Composiciones limpiadoras

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

Dichas composiciones limpiadoras comprenden un adyuvante limpiador/detergente, preferiblemente una mezcla de componentes. De forma típica, el adyuvante limpiador estará presente en la composición en una cantidad de 0,001 a 99,9 % en peso, de forma más típica de 0,01 a 80 % en peso de adyuvante de limpieza. Los adyuvantes de limpieza adecuados comprenden: tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, blanqueadores, catalizadores del

blanqueador, colorantes, reforzadores del blanqueador, agentes quelantes, agentes de transferencia de colorantes, adyuvantes de deposición, tensioactivos, enzimas adicionales, y estabilizantes de enzimas, materiales catalíticos, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, abrillantadores ópticos, fotoactivadores, fluorescente, agentes matizadores de tejidos, acondicionadores de tejidos, perácidos preformados, tensioactivos poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de manchas de arcilla, sales de carga, hidrótrofos, 5 abrillantadores, supresores de jabonaduras, agentes elasticadores de estructuras, suavizantes de tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes antiencogimiento, germicidas, fungicidas, agentes contra el deslustre, agentes anticorrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, vehículos, auxiliares de procesamiento, pigmentos, perfumes, agentes de control del pH, encapsulados, polímeros. Por ejemplo, estos pueden incluir ingredientes 10 blanqueadores tales como un reforzador del blanqueador de imina; fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato y/o perborato, especialmente percarbonato recubierto con un material tal como una sal de carbonato y/o de sulfato, sal de silicato, borosilicato, y cualquier mezcla de los anteriores; perácido preformado, incluido perácido preformado en forma encapsulada; catalizadores de metales de transición; supresores de jabonaduras o sistemas supresores tales como supresores de jabonaduras basados en silicona y/o supresores de jabonaduras basados en ácidos 15 grasos; suavizantes de tejidos tales como arcilla, silicona y/o compuestos de amonio cuaternario; floculantes tales como poli(óxido de etileno); inhibidores de transferencia de colorantes tales como polivinilpirrolidona, poli(N-óxido de 4-vinilpiridina) y/o copolímero de vinilpirrolidona y vinilimidazol; componentes para la integridad de tejidos tales como oligómeros producidos por la condensación de imidazol y epíclorhidrina; dispersantes de la suciedad y coadyuvantes antirredeposición de suciedad tales como poliaminas alcoxladas y polímeros de etilenimina etoxilada; componentes 20 antirredeposición, tales como poliésteres; polímeros de carboxilato tales como polímeros de ácido maleico o copolímeros de ácido maleico y acrílico; perfumes tales como microcápsulas de perfume; acordes encapsulados en almidón, perfumes depositados mediante pulverización; anillos de jabón; partículas estéticas; tintes; cargas como sulfato sódico, aunque se prefiere que la composición esté prácticamente exenta de cargas; sal de silicato como el silicato de sodio, incluidos el silicato de sodio 1.6R y 2.0R, o metasilicato sódico; copoliésteres de ácidos dicarboxílicos y dioles; polímeros celulósicos 25 tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietoxilcelulosa u otra celulosa alquílica o alquilalcoxílica; disolventes tales como 1,2-propanodiol, monoetanolamina; dietilenglicol, etanol y cualquier mezcla de los anteriores; hidrótrofos tales como cumenosulfonato de sodio, xilenosulfonato de sodio, toluenosulfonato de sodio, y cualquiera de sus mezclas; ácidos orgánicos tales como ácido cítrico; y cualquier combinación de los mismos. La composición puede ser tal que el adyuvante de limpieza comprenda uno o más seleccionados del grupo que consiste en (i) microcápsula de perfume; (ii) agente de 30 matizado de tejidos; (iii) proteasa; (iv) polímero anfífilo limpiador; (v) lipasa, o (vi) mezclas de los mismos.

En otro aspecto preferido, la composición comprende uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluidos los tensioactivos semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o de ion híbrido y/o anfóteros y/o no iónicos semipolares y/o mezclas de los mismos. Los tensioactivos están presentes de forma típica a un nivel de 0,1 % a 35 60 % en peso o de 0,5 a 50 % en peso o 1 a 40 % en peso de la composición.

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

Cuando se incluyen en la anterior, el agente limpiador contendrá normalmente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 40 % de un tensioactivo no iónico tal como un alcohol etoxilado, nonilfenol etoxilado, alquilpoliglicósico, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido 45 graso, amida de ácido graso polihidroxlado, o derivados de N-acilo y N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

La composición limpiadora puede comprender una o más enzimas diferentes. Por lo tanto, una composición preferida comprende (a) una variante de una alfa-amilasa original, en donde dicha variante comprende (i) una modificación en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las 50 posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304 y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1, (ii) dicha variante tiene al menos 80, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y (iii) dicha variante tiene actividad de alfa-amilasa; y (b) una o más enzimas 55 adicionales seleccionadas preferiblemente del grupo que consiste en 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 xilanas. La enzima o enzimas adicionales se 60 pueden producir, por ejemplo, mediante un microorganismo que pertenece al género *Aspergillus*, p. ej., *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, p. ej., *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*; 65

Humicola, p. ej., *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, p. ej., *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

Preferiblemente, la composición comprende una proteasa o mezclas de más de una proteasa, una lipasa o mezclas de más de una lipasa, una peroxidasa o mezclas de más de una peroxidasa, una o más enzimas amilolíticas adicionales, p. ej., una alfa-amilasa adicional, glucoamilasa, amilasa maltogénica, preferiblemente una alfa amilasa adicional, una o mezclas de más de una CGTasa y/o una celulasa o mezclas de más de una celulasa, mananasa (tal como MANNAWAY™ de Novozymes, Dinamarca) o mezclas de más de una mananasa, pectinasa, pectato liasa, cutinasa y/o lacasa o mezclas de más de uno de uno o más de estos.

En general, las propiedades de la enzima o enzimas seleccionadas deberán ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimático, etc.), y la enzima o enzimas deberán estar presentes en una cantidad eficaz. Preferiblemente, el producto de la invención comprende al menos 0,01 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 6, especialmente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 mg de enzima adicional activa/g de composición.

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

(a) subtilisinas (EC 3.4.21.62), incluidas las derivadas de *Bacillus*, tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en US-6.312.936 B1, US-5.679.630, US-4.760.025, US-7.262.042 y W009/021867.

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

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

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

Las enzimas proteasas adecuadas comerciales incluyen las que se venden con los nombres comerciales Alcalase®, Savinase®, Primase®, Durazym®, Polarzyme®, Kannase®, Liqueanase®, Liqueanase Ultra®, Savinase Ultra®, Ovozyme®, Neutrase®, Everlase® y Esperase® por Novozymes A/S (Dinamarca), las que se venden con el nombre comercial Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Properase®, Purafect®, Purafect Prime®, Purafect Ox®, FN3®, FN4®, Excellase® y Purafect OXP® por Genencor International, las que se venden con el nombre comercial Opticlean® y Optimase® por Solvay Enzymes, las comercializadas por Henkel/ Kemira, especialmente BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 de US-5.352.604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, denominada a continuación como BLAP), BLAP R (BLAP con S3T + V4I + V199M + V205I + L217D), BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I) y BLAP F49 (BLAP con S3T + V4I + A194P + V199M + V205I + L217D) - todas de Henkel/Kemira; y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus* con mutaciones A230V + S256G + S259N) de Kao. Otras proteasas adecuadas se describen en WO 2011/03623, WO 2011/140316, WO2011/140364 y WO2012/05778.

Lipasas: Las lipasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo *Thermomyces*), p. ej., de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*), o de *H. insolens*, una lipasa de *Pseudomonas*, p. ej., de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705, *P. wisconsinensis*, una lipasa de *Bacillus*, p. ej., de *B. subtilis* (Dartois y col. (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* o *B. pumilus*.

La lipasa puede ser una "lipasa de primer ciclo" tal como la descrita en US-6.939.702 B1 y US-PA 2009/0217464. En un aspecto, la lipasa es una lipasa de primer lavado, preferiblemente una variante de la lipasa de tipo silvestre procedente de *Thermomyces lanuginosus* que comprende las mutaciones T231R y N233R. La secuencia de tipo silvestre tiene los 269 aminoácidos (aminoácidos 23 – 291) del número de registro Swissprot Swiss-Prot O59952 (derivada de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*)). Las lipasas preferidas incluirían las comercializadas con el nombre comercial Lipex®, Lipolex® y Lipoclean®.

Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum*.

En un aspecto, las enzimas preferidas incluyen endoglucanasas derivadas de microorganismos con actividad endo-beta-1,4-glucanasa (E.C. 3.2.1.4), preferentemente seleccionada del grupo que comprende:

- 5 (a) un polipéptido bacteriano endógeno para un miembro del género *Bacillus* que tiene una secuencia con una identidad de al menos 90 %, 94 %, 97 % e incluso del 99 % con la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º:2 del US-7.141.403B2;
- 10 (b) una glicosil hidrolasa que tiene actividad enzimática tanto frente a xiloglucano como frente a sustratos de celulosa amorfa, en donde la glicosil hidrolasa se selecciona de familias de 5, 12, 44 o 74 GH;
- (c) una glicosil hidrolasa que tiene una secuencia con una identidad de al menos 90 %, 94 %, 97 % e incluso del 99 % con la secuencia de la SEC ID N.º:3 del WO09/148983;
- 15 (d) y mezclas de los mismos.

Las endoglucanasas adecuadas se venden con los nombres comerciales Celluclean® y Whitezyme® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).

- 20 Otras celulosas comercialmente disponibles incluyen CELLUZYME®, y CAREZYME® (Novozymes A/S), CLAZINASE®, y PURADAX HA® (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)® (Kao Corporation).

Otras amilasas: Preferiblemente, la composición comprende una amilasa adicional. Amilasas adicionales adecuadas incluyen las alfa-amilasas, incluidas las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados química o genéticamente (variantes). Una alfa-amilasa alcalina preferida se deriva de una cepa de *Bacillus*, tal como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, u otro *Bacillus sp.*, tal como *Bacillus sp.* NCBI 12289, NCBI 12512, NCBI 12513, DSM 9375 (USP 7.153.818) DSM 12368, DSMZ n.º 12649, KSM AP1378 (WO 97/00324), KSM K36 o KSM K38 (EP 1.022.334). Las amilasas adicionales preferidas pueden seleccionarse de: (a) las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO96/23874 y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones respecto de la enzima enumerada como Id. de sec. n.º 2 en WO 96/23874: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444; (b) las variantes descritas en WO 96/23873, WO00/60060, WO06/002643 y WO2017/192657, especialmente las variantes con una o más sustituciones en las siguientes posiciones respecto de la enzima AA560 enumerada como Id. de sec. n.º: 12 en WO 06/002643: 26, 30, 33, 82, 37, 106, 118, 128, 133, 149, 150, 160, 178, 182, 186, 193, 203, 214, 231, 246, 256, 257, 258, 269, 270, 272, 283, 295, 296, 298, 299, 303, 304, 305, 311, 314, 315, 318, 319, 339, 345, 361, 378, 383, 419, 421, 437, 441, 444, 445, 446, 447, 450, 461, 471, 482, 484, preferiblemente que contienen también las delecciones de D183* y G184*; (c) las variantes que presentan al menos 90 % de identidad con la Id. de sec. n.º: 4 en WO06/002643, la enzima de tipo silvestre procedente de *Bacillus* SP722, especialmente las variantes con delecciones en las posiciones 183 y 184 y las variantes descritas en WO 00/60060; (d) las variantes que muestran al menos 95 % de identidad con la enzima de tipo silvestre procedente de *Bacillus sp.*707 (Id. de sec. n.º: 7 de US-6.093.562), especialmente las que comprenden una o más de las siguientes mutaciones M202, M208, S255, R172, y/o M261. Preferiblemente dicha amilasa comprende una o más de M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q, M202W, S255N y/o R172Q. Son especialmente preferidas aquellas que comprenden las mutaciones M202L o M202T; (e) las variantes descritas en WO 09/149130, preferiblemente aquellas que presentan al menos 90 % de identidad con la Id. de sec. n.º:1 o Id. de sec. n.º: 2 en WO 09/149130, la enzima de tipo silvestre de *Geobacillus stearothermophilus* o una versión truncada del mismo; (f) las variantes que presentan al menos 89 % de identidad con la Id. de sec. n.º: 1 en WO2016091688, especialmente aquellas que comprenden delecciones en las posiciones H183+G184 y adicionalmente una o más mutaciones en las posiciones 405, 421, 422 y/o 428; (g) las variantes que presentan al menos 60 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la “ α -amilasa PcuAmyl” de *Paenibacillus curdlanolyticus* YK9 (Id. de sec. n.º: 3 en WO2014099523); (h) las variantes que presentan al menos 60 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la “amilasa CspAmy2” de *Cytophaga sp.* (Id. de sec. n.º: 1 en WO2014164777); (i) las variantes que presentan al menos 85 % de identidad con AmyE de *Bacillus subtilis* (Id. de sec. n.º: 1 en WO2009149271); (j) las variantes que presentan al menos 90 % de identidad con la amilasa de tipo silvestre de *Bacillus sp.* KSM-K38 con el número de acceso AB051102; (k) las variantes que presentan al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos madura de AA10 de *Bacillus sp* (Id. de sec. n.º: 7 en WO2016180748); (l) las variantes que presentan al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos madura de *Alicyclobacillus sp.* amilasa (Id. de sec. n.º: 8 en WO2016180748); o mezclas de los mismos. Cuando está presente, la composición de la invención comprende preferiblemente de al menos 0,01 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 6, especialmente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 mg de amilasa activa adicional/g de composición.

Las alfa-amilasas comercialmente disponibles adecuadas incluyen DURAMYL®, LIQUEZYME®, TERMAMYL®, TERMAMYL ULTRA®, NATALASE®, SUPRAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, FUNGAMYL®, ATLANTIC®, INTENSA® y BAN® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), KEMZYME® AT 9000 Biozym Biotech Trading GmbH Wehlstrasse 27b A-1200 Wien Austria, las series RAPIDASE®, PURASTAR®, ENZYSE®,

OPTISIZE HT PLUS®, POWERASE®, PREFERENZ S® (incluidos PREFERENZ S1000® y PREFERENZ S2000® y PURASTAR OXAM® (DuPont., Palo Alto, California) y KAM® (Kao, 14-10 Nihonbashi Kayabacho, 1-chome, Chuo-ku Tokyo 103-8210, Japón). En un aspecto, las amilasas adecuadas incluyen ATLANTIC®, STAINZYME®, POWERASE®, INTENSA® y STAINZYME PLUS® y mezclas de las mismas.

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

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

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

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

Los granulados sin polvo se pueden producir, y, opcionalmente pueden revestirse mediante métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de materiales de recubrimiento cerúleos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) que tienen pesos moleculares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y que tienen de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y monoglicéridos y diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos. Los materiales de recubrimiento formadores de película pueden aplicarse, por ejemplo, mediante técnicas de lecho fluido. Las preparaciones de enzima líquida pueden, por ejemplo, estabilizarse por adición de un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol azucarado, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos.

La composición puede comprender un agente de matizado de tejidos (denominados a veces agentes tonalizadores, azulantes o blanqueadoras). De forma típica el agente de matizado proporciona al tejido un tono azul o violeta. Los agentes de matizado se pueden utilizar solos o combinados para crear un determinado matiz y/o para proporcionar tonalidades a diferentes tipos de tejido. Esto puede proporcionarse, por ejemplo, mezclando un tinte rojo y un tinte verde-azulado para obtener una tonalidad azul o violeta. Los agentes de matizado se pueden seleccionar de cualquier clase química conocida de tinte, incluidos, aunque no de forma limitativa, acridina, antraquinona (incluidas quinonas policíclicas), azina, azo (p. ej., monoazo, disazo, trisazo, tetrakisazo, poliazos), incluido azo premetalizado, benzodifurano y benzodifuranona, carotenoide, cumarina, cianina, diazahemicianina, difenilmetano, formazano, hemicianina, indigoides, metano, naftalimidas, naftoquinona, nitro y nitroso, oxazina, ftalocianina, pirazoles, estilbeno, estirilo, triarilmetano, trifenilmetano, xantenos y mezclas de los mismos.

Los agentes de matizado de tejidos incluyen tintes, conjugados de tinte-arcilla y pigmentos orgánicos e inorgánicos. Los tintes adecuados incluyen pequeñas moléculas de tinte y moléculas poliméricas. Tintes en forma de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes en forma de moléculas pequeñas seleccionados del grupo que consiste en tintes pertenecientes a las clasificaciones Colour Index (índice de color) Direct, Basic, Reactive o Reactive hidrolizado, Solvent o Disperse, por ejemplo, clasificados como Blue, Violet, Red, Green o Black y que proporcionan la tonalidad deseada solos o combinados. En otro aspecto, los tintes en forma de moléculas pequeñas incluyen tintes en forma de moléculas pequeñas seleccionados del grupo que consiste en los números de Colour Index de la sociedad de la industria del tinte y la coloración (Society of Dyers and Colourists de Bradford, Reino Unido) Direct Violet tales como 9, 35, 48, 51, 66 y 99, Direct Blue tales como 1, 71, 80 y 279, Acid Red tales como 17, 73, 52, 88 y 150, Acid Violet tales como 15, 17, 24, 43, 49 y 50, Acid Blue tales como 15, 17, 25, 29, 40, 45, 75, 80, 83, 90 y 113, Acid Black tal como 1, Basic Violet tales como 1, 3, 4, 10 y 35, Basic Blue tales como 3, 16, 22, 47, 66, 75 y 159, Disperse o Solvent como los descritos en EP-1794275 o EP-1794276, o tintes como los que se describen en US-7.208.459 B2 y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de moléculas pequeñas adecuados seleccionados del grupo que consiste en los números C.I. 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 covalentemente unidos, (a veces denominados conjugados), (conjugados de tinte polimérico), por ejemplo, polímeros con cromógenos copolimerizados en la cadena principal del polímero y mezclas de los mismos. Tintes poliméricos incluyen los descritos en WO2011/98355, WO2011/47987, US-2012/090102, WO2010/145887, WO2006/055787 y WO2010/142503.

En otro aspecto, los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en colorantes con elevada afinidad por el tejido 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® Violet CT, carboximetilcelulosa (CMC) covalentemente unida a un tinte reactive blue, reactive violet o reactive red tal como 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 colorantes de matizado preferidos incluyen los agentes blanqueadores azoicos de tiofeno alcoxilados encontrados en US 2008/0177090 que pueden ser opcionalmente aniónicos, tales como los seleccionados de los Ejemplos 1-42 en la Tabla 5 de WO 2011/011799. En US-8138222 se describen otros tintes preferidos.
- Los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que comprende, al menos, un tinte catiónico/básico y una arcilla de tipo esmectita, y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que consiste en un tinte catiónico/básico seleccionado del grupo que consiste en C.I. Basic Yellow, del 1 al 108, C.I. Basic Orange, del 1 al 69, C.I. Basic Red, del 1 al 118, C.I. Basic Violet, del 1 al 51, C.I. Basic Blue, del 1 al 164, C.I. Basic Green, del 1 al 14, C.I. Basic Brown, del 1 al 23; C.I. Basic Black, del 1 al 11; y una arcilla seleccionada del grupo que consiste en arcilla de tipo montmorillonita, arcilla de tipo hectorita, arcilla de tipo saponita y mezclas de los mismos. En otro aspecto adicional, los conjugados de arcilla-tinte adecuados incluyen conjugados de arcilla-tinte seleccionados del grupo que consiste en: conjugado de montmorillonita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de montmorillonita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de montmorillonita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de montmorillonita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de montmorillonita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de montmorillonita C.I. Basic Black 2, conjugado de hectorita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de hectorita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de hectorita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de hectorita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de hectorita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de hectorita C.I. Basic Black 2, conjugado de saponita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de saponita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de saponita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de saponita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de saponita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de saponita C.I. Basic Black 2 conjugado y mezclas de los mismos.
- Los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en flavantrona, indantrona, indantrona clorada que contiene de 1 a 4 átomos de cloro, pirantrona, dicloropirantrona, monobromodicloropirantrona, dibromodicloropirantrona, tetrabromopirantrona, diimida del ácido perilen-3,4,9,10-tetracarboxílico, en donde los grupos imida pueden ser no sustituidos o sustituidos por alquilo C1-C3 o un radical fenilo o heterocíclico, y en donde los radicales fenilo y heterocíclicos pueden, de forma adicional, llevar sustituyentes que no confieran solubilidad en agua, amidas del ácido antrapirimidincarboxílico, violantrona, isoviolantrona, pigmentos de tipo dioxazina, ftalocianina de cobre, que puede contener hasta 2 átomos de cloro por molécula, ftalocianina de policloro-cobre o ftalocianina de polibromocloro-cobre que contiene hasta 14 átomos de bromo por molécula y mezclas de los mismos.
- En otro aspecto, los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en Ultramarine Blue (nombre C.I. Pigment Blue 29), Ultramarine Violet (C.I. Pigment Violet 15) y mezclas de los mismos. Aditivos reforzantes de la detergencia - La composición limpiadora puede comprender además aditivos reforzantes de la detergencia, tales como aditivos reforzantes de la detergencia de tipo carbonato, bicarbonato o silicatos, que pueden ser zeolitas tales como Zeolita A, Zeolita MAP (Maximum Aluminium type P). Las zeolitas que pueden utilizarse para el lavado de ropa tienen preferiblemente la fórmula $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$ y el tamaño de partículas es normalmente entre 1-10 μm para la zeolita A y 0,7-2 μm para la zeolita MAP. Otros aditivos reforzantes de la detergencia son el metasilicato sódico ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ o $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot n \text{H}_2\text{O}$) fuertemente alcalino y preferiblemente utilizado en el lavado de vajillas. En realizaciones preferidas, la cantidad de aditivo reforzante de la detergencia puede ser superior a 5 %, superior a 10 %, superior a 20 %, superior a 30 %, superior a 40 % o superior a 50 %, y puede ser inferior a 80 %, 65 %. En un detergente para lavado de vajillas, el nivel de aditivo reforzante de la detergencia es de forma típica 40-65 %, especialmente 50-65 % o incluso 75-90 %.
- Encapsulados - La composición puede comprender un encapsulado. En un aspecto, un encapsulado comprende un núcleo, una envoltura que tiene una superficie interior y una superficie exterior, encapsulando dicha envoltura dicho núcleo.
- En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en perfumes; abrillantadores; tintes; repelentes de insectos; siliconas; ceras; agentes saborizantes; vitaminas; agentes suavizantes de tejidos; agentes para el cuidado de la piel, en un aspecto, parafinas; enzimas; agentes antibacterianos; blanqueadores; estimulantes sensoriales; y mezclas de los mismos; y dicha envoltura puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en polietilenos; poliamidas; poliestirenos; poliisoprenos; policarbonatos; poliésteres; poliácridatos; aminoplastos, en un aspecto, dicho aminoplasto puede comprender poliureas, poliuretano, y/o poliureauretano, en un aspecto, dicha poliurea puede comprender polioximetilenurea y/o melamina formaldehído; poliolefinas; polisacáridos, en un aspecto dicho polisacárido puede comprender alginato y/o quitosana; gelatina; goma laca; resinas epoxi; polímeros de vinilo; compuestos inorgánicos insolubles en agua; silicona; y mezclas de los mismos.
- En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender perfume. Dichos encapsulados son microcápsulas de perfume.

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

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

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

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

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

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

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

35 Las cápsulas adecuadas se pueden adquirir en Appleton Papers Inc. de Appleton, Wisconsin EE.UU.

40 Además, los materiales para fabricar los encapsulados anteriormente mencionados se pueden obtener de Solutia Inc. (St Louis, Missouri EE. UU.), Cytec Industries (West Paterson, New Jersey EE. UU.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri EE. UU.), CP Kelco Corp. de San Diego, California, EE. UU.; BASF AG de Ludwigshafen, Alemania; Rhodia Corp. de Cranbury, Nueva Jersey, EE. UU.; Hercules Corp. de Wilmington, Delaware, EE. UU.; Agrium Inc. de Calgary, Alberta, Canadá, ISP de New Jersey EE. UU., Akzo Nobel de Chicago, IL, EE. UU.; Stroeve Shellac Bremen de Bremen, Alemania; Dow Chemical Company de Midland, MI, EE. UU.; Bayer AG de Leverkusen, Alemania; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, EE. UU.

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

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

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

60 Polímeros

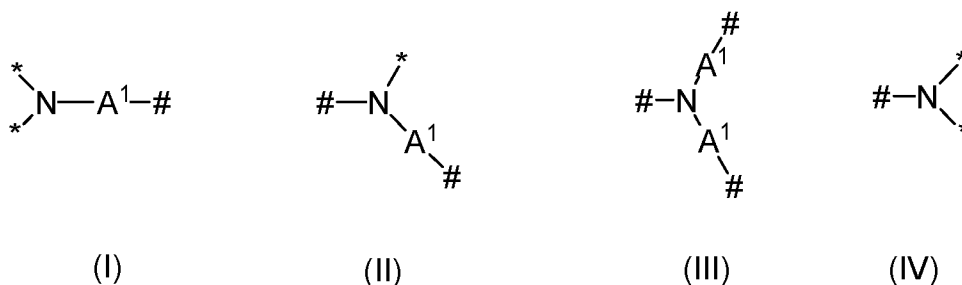
El producto de consumo puede comprender uno o más polímeros. Los ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpiririna-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico y polímeros anfifílicos.

Polímeros anfifílicos limpiadores

Preferiblemente, el polímero limpiador anfifílico es 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.

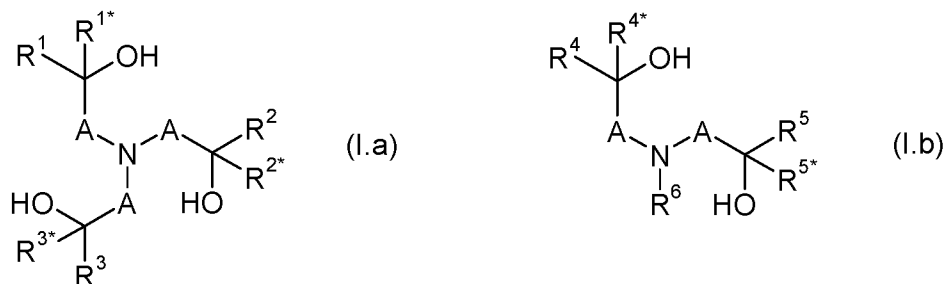
Los polímeros limpiadores de grasa anfifílicos alcoxilados de la presente invención se refieren a cualquier polímero alcoxilado con propiedades hidrófilas e hidrófobas equilibradas de manera que extraigan las partículas de grasa de los tejidos y las superficies. Realizaciones específicas de los polímeros limpiadores de grasa anfifílicos alcoxilados de la presente invención comprenden una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos alcoxilados unidos a dicha estructura de núcleo. Estos pueden comprender polialquilenimininas alcoxiladas, preferiblemente que tienen un bloque de óxido de polietileno interno y un bloque de óxido de polipropileno externo.

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



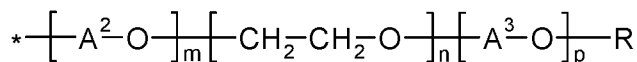
en donde # denota, en cada caso, una mitad de un enlace entre un átomo de nitrógeno y la posición de unión libre de un grupo A¹ de dos unidades repetitivas adyacentes de las fórmulas (I), (II), (III) o (IV); * en cada caso denota una mitad de un enlace a uno de los grupos alcoxilato; y A¹ se selecciona, independientemente, de 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+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 P_m de la estructura de núcleo de polialquilenimina es un valor en el intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 10.000 g/mol.

La estructura de núcleo puede comprender alternatively 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 se selecciona independientemente de 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 se selecciona independientemente de unidades alquilenoxi de la fórmula (V)



(V)

en donde * denota en cada caso, una mitad de un enlace al átomo de nitrógeno de la unidad repetitiva de la 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 anfílicos 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. Determinadas realizaciones 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 alquilenos A y distribuidos 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).

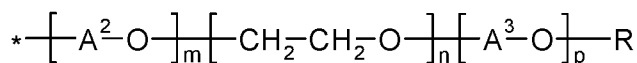
Puesto que la ciclación puede producirse en la formación de la cadena principal de tipo polialquilenimina, también es posible que los restos amino cíclicos estén presentes en pequeña cantidad en la cadena principal. Dichas polialquileniminas que contienen restos amino cíclicos están, por supuesto, alcoxiladas 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, P_m, promedio 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 alquilenos C₂-C₆ lineales o ramificados, idénticos o diferentes tales como 1,2-etileno, 1,2-propileno, 1,2-butileno, 1,2-isobutileno, 1,2-pentanodilo, 1,2-hexanodilo o hexametileno. Un alquilenos ramificado preferido es 1,2-propileno. Son un alquilenos lineal preferido el etileno y el hexametileno. Un alquilenos 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:

A² se selecciona, en cada caso, de 1,2-propileno, 1,2-butileno y 1,2-isobutileno; preferiblemente, A² es 1,2-propileno. A³ es 1,2-propileno; R se selecciona, en cada caso, de hidrógeno y alquilo C₁-C₄, tal como 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 alcoxi 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 estructura 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 por lo general no afecta las propiedades de rendimiento de la polialquilenimina alcoxilada y de esta forma no constituye una medida preferida.

Los polímeros anfífilicos alcoxilados limpiadores de grasa están presentes en los productos para el cuidado de tejidos y del hogar, incluidos, aunque no de forma limitativa detergentes de la presente invención a niveles en el intervalo de aproximadamente 0,05 % a 10 % en peso de la composición para el producto del cuidado de tejidos y del hogar. Las realizaciones de los productos para el cuidado de tejidos y del hogar 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.

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

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



en donde:

a, b y c son de 1 a 200;

d, e y f son de 1 a 50;

Ar es un fenileno sustituido en 1,4;

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

Me es Li, K, Mg/2, Ca/2, Al/3, amonio, mono-, di-, tri-, o tetraalquilamonio en donde los grupos alquilo son alquilo C_1-C_{18} o hidroxialquilo C_2-C_{10} , o mezclas de los mismos;

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente de H o n-alquilo o iso-alquilo C_1-C_{18} ; y

R^7 es un grupo alquilo C_1-C_{18} lineal o ramificado, o un grupo alquenoilo C_2-C_{30} lineal o ramificado, o un grupo cicloalquilo con 5 a 9 átomos de carbono, o un grupo arilo C_8-C_{30} , o un grupo arilalquilo de C_6-C_{30} .

Los polímeros para la liberación de la suciedad adecuados son los polímeros para la liberación de la suciedad de poliéster tales como los polímeros Repel-o-tex, incluidos Repel-o-tex SF, SF-2 y SRP6 suministrados por Rhodia.

Otros polímeros de liberación de suciedad adecuados incluyen los polímeros Texcare, incluidos Texcare SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 y SRN325 comercializados por Clariant. Otros polímeros para la liberación de la suciedad adecuados son los polímeros Marloquest tales como Marloquest SL suministrados por Sasol.

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

El detergente puede incluir un sistema blanqueador, que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que puede combinarse con un activador del blanqueador formador de perácido tal como una tetraacetiletilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueador puede comprender peroxiácidos de tipo, p. ej., la amida, imida, o sulfona. En general, cuando se utiliza un agente blanqueante, las composiciones de la presente invención pueden comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 %, de agente blanqueante en peso de la composición de la invención limpiadora.

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

Las variantes de la enzima de la invención se pueden estabilizar usando agentes estabilizantes convencionales, y/o inhibidores de la proteasa p. ej., un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol azucarado, sales tales como cloruro sódico y cloruro potásico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, p. ej., un éster de borato aromático, o un derivado del ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, o un aldehído péptido tal como aldehídos di-, tri- o tetrapéptidos o análogos de aldehído (bien en la forma de B1-B0-R en donde, R es H, CH₃, CX₃, CHX₂, o CH₂X (X=halógeno), B0 es un resto de aminoácido simple (preferiblemente con una cadena lateral alifática o aromática opcionalmente sustituida); y B1 consiste en uno o más restos de aminoácidos (preferiblemente uno, dos o tres) que comprende opcionalmente un grupo protector del extremo N, o como se describe en WO09118375, WO98/13459) o un inhibidor de proteasa de tipo proteico tal como RASI, BASI, WASI (inhibidores bifuncionales de alfa-amilasa/subtilisina de arroz, cebada y trigo) o Cl2 o SSI. En algunas modalidades, las enzimas empleadas en la presente invención se estabilizan por la presencia de fuentes solubles en agua de zinc (II), calcio (II) y/o iones (II) magnesio en las composiciones terminadas que proporcionan dichos iones a las enzimas, así como además otros iones de metal (p. ej., bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II), y oxovanadio(IV)).

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

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

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

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

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

Ejemplos

Ensayo pNP-G7 para determinar la actividad alfa-amilasa

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

Reactivos:

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

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

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

Tampón de dilución: MOPS 50 mM, Triton X100 (polietilenglicol *p*-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-feniléter (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n (n = 9-10))) al 0,05 % (p/v), CaCl₂ 1 mM, pH8,0.

Procedimiento:

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

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

Ensayo de tensión mecánica automático (AMSA) para lavado de ropa

Para evaluar la capacidad limpiadora en el lavado de ropa, se llevaron a cabo experimentos de lavado usando el ensayo de tensión mecánica automático (AMSA). Con el AMSA, se puede examinar la capacidad limpiadora de una gran cantidad de soluciones detergentes que contienen enzima de pequeño volumen. La placa AMSA tiene numerosas ranuras para soluciones de ensayo y una tapa que frota fuertemente la muestra de ropa, la tela a lavar, contra todas las aberturas de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, soluciones de ensayo, tela y tapa, se agitan intensamente para poner la solución de ensayo en contacto con la tela y aplicar tensión mecánica de una forma periódica oscilante. Para una descripción detallada, véase WO02/42740 especialmente el párrafo “Realizaciones especiales del método” en la página 23-24.

Descripción general de la capacidad limpiadora

Se prepara una solución de ensayo que comprende agua (10 °dH), detergente, p. ej., 5,1 g/l de detergente líquido europeo tal como se describe a continuación y la enzima de la invención, p. ej., a una concentración de 0, 0,8 y/o 1,2 mg de proteína enzimática/l. Se añaden las telas manchadas con almidón (p. ej., CS-28 del Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT, Vlaardingen, Países Bajos) y se lavan durante 20 minutos a 20 °C. Después del enjuague completo bajo agua corriente y secado en la oscuridad, se miden posteriormente los valores de intensidad de luz o de reflectancia de las telas manchadas como una medida de la capacidad limpiadora. El ensayo con 0 mg de proteína enzimática/l se utilizó como blanco para obtener un valor de remisión delta. Preferiblemente se aplica acción mecánica durante la etapa de lavado, p. ej., en forma de agitación, giro o revolución de la solución de lavado con el tejido.

Los experimentos de capacidad limpiadora AMSA se llevaron a cabo en las condiciones especificadas a continuación:

Tabla 1: Condiciones experimentales AMSA

Dosificación del detergente líquido para lavado de ropa	5,7 g/l de detergente líquido modelo europeo (EU) (véase el Ejemplo 1A), o 0,8 g/l de detergente líquido modelo norteamericano (US) (véase el Ejemplo 1B)
Volumen de la solución de ensayo	160 micro l
pH	en el estado en que se encuentra
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	20 °C
Dureza del agua	10 °dH, $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{HCO}_3^- = 3:1:6$
Concentración de enzima en la solución de ensayo	0,8 y 1,2 mg/l
Material de ensayo	CS-28 (Almidón de arroz sobre algodón)

Tampón de dilución de amilasa: La amilasa se diluyó en agua ultrapura (agua MilliQ) con una pequeña concentración de calcio (0,1 mM) para estabilizar la amilasa durante el almacenamiento y 0,01 % de Triton X-100 para reducir el riesgo de adsorción de la proteína enzimática en los recipientes y pipetas.

La dureza del agua se ajustó a 10°dH mediante la adición de CaCl_2 , MgCl_2 , y NaHCO_3 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{HCO}_3^- = 3:1:4,5$) al sistema de ensayo. Tras el lavado, las telas se enjuagaron con agua corriente y se secaron.

La capacidad limpiadora se mide como el brillo del color del tejido lavado. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada desde la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra se mancha, la intensidad de la luz reflejada es menor al de la muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede utilizarse para medir la capacidad limpiadora.

Las mediciones de color se realizan con un escáner profesional plano (Kodak iQsmart, Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Dinamarca), que se usó para capturar una imagen del textil lavado.

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

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

Los resultados del ensayo de lavado de ropa AMSA sobre diferentes variantes se muestran en la Tabla 1 y 2. En el resultado, el índice es 100. El resultado de la capacidad de la alfa-amilasa precursora recibe el valor de 100 y los resultados de las variantes se comparan con este valor.

Capacidad limpiadora LOM

La dureza del agua se ajustó a la resistencia descrita a continuación mediante la adición de CaCl_2 , MgCl_2 y NaHCO_3 . Se prepararon soluciones de lavado con la cantidad deseada de detergente, temperatura y dureza del agua en un recipiente como se describe más adelante. El detergente se disolvió con agitación magnética durante 10 minutos (la solución de lavado se utilizó en un plazo de 30 a 60 min después de la preparación).

La temperatura y la rotación (rpm) en el baño de agua del laundrometro se ajustaron según la configuración que se indica a continuación en la Tabla 2. Cuando la temperatura se ajustó según la configuración (la tolerancia es +/- 0,5 °C), se añadió la solución de lavado al vaso de precipitados LOM según la cantidad que se describe a continuación.

La agitación del vaso de precipitados fue de 200 rpm. Se añadieron 2 muestras de almidón de arroz hecho a mano (CS-28 HM), 2 muestras de almidón de tapioca hecho a mano (CS-29 HM) y balasto de suciedad a cada uno de los vasos de precipitados, y el lavado se llevó a cabo según la temporalización que se indica a continuación. Las muestras se enjuagaron en agua de grifo fría durante 5 minutos y se colocaron en una bolsa de lavado y se enjuagaron en una lavadora (AEG ÖKO LAVAMAT 86820) en el programa "STIVN". Las muestras se clasificaron y se dejaron secar entre papel de filtro en un armario de secado sin calor durante la noche.

La muestra de tejido CS-28 HM (almidón de arroz sobre algodón, 5 x 5 cm, almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro) y CS-29 HM (almidón de tapioca sobre algodón, 5 x 5 cm, almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro) y CS-26 HM (almidón de maíz sobre algodón, 5 x 5 cm, almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro) se obtuvieron de Center for Test Materials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos.

El algodón de punto blanco se utilizó como balasto de suciedad y se obtuvo de Warwick Equest Ltd, Unidad 55, Consett Business Park, Consett, Condado de Durham, DH8 6BN Reino Unido.

Tabla 2: Condiciones experimentales

	Condiciones europeas utilizando el detergente modelo SUD WE	Condiciones europeas utilizando el detergente modelo HDL WE
Dosificación de detergente	1,87 g/l	5,30 g/l
Concentración de enzima en la solución de lavado	0,065 mg de proteína enzimática/l	0,2 mg de proteína enzimática/l
Dureza del agua	20,6 °dH (Ca ²⁺ :Mg ²⁺ :HCO ₃ ⁻ = 4:1:7,5)	
Volumen de la solución de ensayo	1000 ml	
Tiempo de lavado	5-15 minutos, preferiblemente 15 minutos	
Rotación	200 rpm	
pH	en el estado en que se encuentra	
Temperatura	15-40 °C, preferiblemente 15 °C	

Los detergentes y los materiales de ensayo fueron los siguientes:

Detergente líquido para lavado de ropa	Condiciones europeas (WE): SUD WE como se describe en el Ejemplo 2A más abajo y el detergente modelo HDL WE como se describe en el Ejemplo 2B más abajo (detergente K)
Material de ensayo	CS-28 HM (almidón de arroz sobre algodón, muestras de 5 x 5 cm con almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro), CS-29 HM (almidón de tapioca sobre algodón, muestra de 5 x 5 cm con almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro).
Balasto de suciedad	Algodón de punto blanco de tamaño 5 x 5 cm añadido a un peso total de 40 g (40 g que incluye todas las muestras, es decir, balasto y material de ensayo).

La capacidad limpiadora se midió como el brillo del color del tejido lavado expresado en valores de remisión (REM). Los valores de remisión se tomaron con un espectrofotómetro Macbeth 7000 Color Eye. Se midió cada una de las muestras secas. Como había riesgo de interferencia con el fondo, las muestras se colocaron encima de 2 capas de tejido durante la medición de la remisión. La remisión se midió a 460 nm. No se incluyó filtro UV. Se calculó un valor promedio para la remisión de las muestras.

La capacidad limpiadora de diferentes variantes se muestra en la Tabla 5 como factor de mejora (IF) y se calcula como se muestra a continuación:

$$IF = \frac{REM_{\text{Variante}} - REM_{\text{Blanco}}}{REM_{\text{Enzima de referencia}} - REM_{\text{Blanco}}}$$

Ejemplo 1

Capacidad limpiadora de alfa-amilasas mediante ensayo de estrés mecánico automático

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

Descripción general de la capacidad limpiadora

Se prepara una solución de ensayo que comprende agua (6 °dH o 15 °dH), 0,79 g/l de detergente, *p. ej.*, el detergente modelo J como se describe a continuación, y la enzima de la invención a una concentración de 0 o 0,2 mg de proteína enzimática/l. Los tejidos teñidos con almidón (CS-28 del Center for Test materials BV, P.O. Box 120, 3133 KT, Vlaaringen, Países Bajos) se añaden y lavan durante 10 minutos a 20 °C y 40 °C, o de forma alternativa, 10 minutos a 20 °C y 30 °C como se especifica en los ejemplos. Después del enjuague completo bajo agua corriente y secado en la oscuridad, se miden posteriormente los valores de intensidad de luz de los tejidos manchados como una medida de la capacidad limpiadora. El ensayo con 0 mg de proteína enzimática/l se utiliza como blanco y corresponde a la aportación del detergente. Preferiblemente se aplica acción mecánica durante la etapa de lavado, *p. ej.*, en forma de agitación, giro o revolución de la solución de lavado con el tejido. Los experimentos de capacidad limpiadora con AMSA pueden llevarse a cabo en las condiciones experimentales especificadas a continuación:

Tabla A: Condición experimental

Detergente	Detergente modelo líquido J (véase la Tabla B)
Dosificación de detergente	0,79 g/l
Volumen de la solución de ensayo	160 micro l
pH	Tal cual
Tiempo de lavado	10 minutos
Temperatura	20 °C o 30 °C
Dureza del agua	6 °dH
Concentración de enzima en la solución de ensayo	0,2 mg de proteína enzimática/l y 0,05 mg de proteína enzimática/l
Material de ensayo	CS-28 (almidón de arroz sobre algodón)

Tabla B: Detergente modelo J

Compuesto	Contenido del compuesto (% p/p)	% del componente activo (% p/p)
LAS	5,15	5,00
AS	5,00	4,50
AEOS	14,18	10,00
Ácido graso de coco	1,00	1,00
AEO	5,00	5,00
MEA	0,30	0,30
MPG	3,00	3,00
Etanol	1,50	1,35
DTPA (como sal de Na5)	0,25	0,10
Citrato sódico	4,00	4,00
Formiato sódico	1,00	1,00
Hidróxido sódico	0,66	0,66
H ₂ O, intercambio de iones	58,95	58,95

La dureza del agua se ajustó a 6 °dH mediante la adición de CaCl₂, MgCl₂, y NaHCO₃ (Ca²⁺:Mg²⁺:HCO₃⁻ = 2:1:4,5) al sistema de ensayo. Tras el lavado, las telas se enjuagaron con agua corriente y se secaron.

Tabla C: Condición experimental

Detergente	Detergente modelo líquido A (véase la Tabla D)
Dosificación de detergente	3,33 g/l

Volumen de la solución de ensayo	160 micro l
pH	Tal cual
Tiempo de lavado	10 minutos
Temperatura	20 °C o 40 °C
Dureza del agua	15°dH
Concentración de enzima en la solución de ensayo	0,2 mg de proteína enzimática/l, 0,05 mg de proteína enzimática/l
Material de ensayo	CS-28 (almidón de arroz sobre algodón)

Tabla D: Detergente modelo A

Compuesto	Contenido del compuesto (% p/p)	% del componente activo (% p/p)
LAS	12,00	11,60
AEOS, SLES	17,63	4,90
Ácido graso de soja	2,75	2,48
Ácido graso de coco	2,75	2,80
AEO	11,00	11,00
Hidróxido sódico	1,75	1,80
Etanol/Propan-2-ol	3,00	2,70/0,30
MPG	6,00	6,00
Glicerol	1,71	1,70
TEA	3,33	3,30
Formiato sódico	1,00	1,00
Citrato sódico	2,00	2,00
DTPPA	0,48	0,20
PCA	0,46	0,18
Fenoxietanol	0,50	0,50
H ₂ O, intercambio de iones	33,64	33,64

La dureza del agua se ajustó a 15 °dH mediante la adición de CaCl₂, MgCl₂ y NaHCO₃ (Ca²⁺:Mg²⁺:HCO₃⁻ = 4:1:7,5) al sistema de ensayo. Tras el lavado, los tejidos se enjuagaron con agua corriente y se secaron.

Tabla E: Condición experimental

Detergente	Composición detergente K
Dosificación de detergente	5,3 g/l
Volumen de la solución de ensayo	160 micro l
pH	Tal cual
Tiempo de lavado	10 minutos
Temperatura	20 °C o 40 °C
Dureza del agua	15°dH
Concentración de enzima en la solución de ensayo	0,2 mg de proteína enzimática/l, 0,05 mg de proteína enzimática/l
Material de ensayo	CS-28 (almidón de arroz sobre algodón)

Tabla F: Detergente K

Compuesto	Contenido del compuesto (% en peso del componente activo)
Alquilbencenosulfonato sódico	8,7
Alquiletoxi 3 sulfato sódico	1,0
Etoxilado 1,5 de 7 alquilo C12-18	5,3
Ácido cítrico	3,1
Abrillantador óptico	0,05

Polipropilenglicol	1,1
Quelante de tipo fosfonato	0,5
Componentes minoritarios (tintes, perfumes, enzimas, estabilizadores de enzimas, disolventes, estructurantes, polímeros) y agua	al 100 %

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

La capacidad limpiadora se mide como el brillo expresado como la intensidad de la luz reflejada por la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra se mancha, la intensidad de la luz reflejada es menor al de la muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede utilizarse para medir la capacidad limpiadora.

Las mediciones de color se realizan con un escáner plano profesional (EPSON Expression 10000XL, EPSON), que se utiliza para capturar una imagen del tejido lavado.

Para extraer un valor de la intensidad de la luz a partir de las imágenes escaneadas, los valores de píxel de color de 48→24 bits de la imagen se convierten en valores de rojo, verde y azul (RGB). El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores de RGB entre sí como vectores y tomando a continuación la longitud del vector resultante:

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

La capacidad limpiadora de las variantes según la invención se muestra en las tablas siguientes. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos del experimento que accede a la capacidad limpiadora en los detergentes modelo A (Tabla D) y J (Tabla B) en diferentes concentraciones (0,05 mg de enzima/l de detergente y 0,2 mg de enzima/l de detergente), y a diferentes temperaturas (20 °C y 40 °C). La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos del experimento que accede a la capacidad limpiadora en el detergente K (Tabla F) en diferentes concentraciones (0,05 mg de enzima/l de detergente y 0,2 mg de enzima/l de detergente) y a diferentes temperaturas (20 °C y 40 °C).

Tabla 3: Resultados de la capacidad limpiadora en detergentes modelo

Mutaciones	0,05 mg/l-A-20 C	0,2 mg/l-A-20 C	0,05 mg/l-A-40 C	0,2 mg/l-A-40 C	0,05 mg/l-J-20 C	0,2 mg/l-J-20 C	0,05 mg/l-J-30 C	0,2 mg/l-J-30 C
Referencia: Id. de sec. n.º: 2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+K320A+M323N+E391A	4,7	1,5	2,3	1,1	2,7	1,1	3,5	1,5
Id. de sec. n.º: 2+ G7A+W284H+K320A+M323N	4,7	1,4	1,8	1,0	3,0	1,1	2,0	1,2
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,7	1,2	1,3	1,3	1,5	1,3	1,1	1,4
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+W284H+E391A	2,3	1,7	2,8	1,4	5,0	2,0	5,5	1,8
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+E391A	0,8	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1	1,3	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+M323S+E391A	1,3	1,9	1,5	1,3	1,5	1,5	1,6	1,6
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+E391A	1,5	1,2	1,3	1,2	1,2	1,1	1,7	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+M323S+E391A	1,3	1,3	1,5	1,1	1,0	1,0	1,2	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+M323N+E391A	1,4	1,3	1,3	1,2	1,0	1,2	1,6	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+W284F+E391A	1,3	1,4	1,3	1,2	0,9	1,2	1,6	1,0
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+W284R+E391A	1,1	1,3	1,0	1,0	0,7	1,2	1,4	0,9
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A	1,1	1,3	0,9	1,1	0,5	1,2	0,8	1,0
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+W284R+E391A	1,0	1,2	0,9	1,1	0,6	1,1	1,1	1,0

Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,0	1,2	0,8	1,0	0,8	1,2	0,9	1,0
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tabla 4: Resultados de la capacidad limpiadora en el detergente K

Mutaciones	0,05 mg/l-K -20 C	0,2 mg/l-K -20 C	0,05 mg/l-K -40 C	0,2 mg/l-K -40 C
Referencia: Id. de sec. n.º: 2	1,0	1,0	1,0	1,0
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+E391A	1,1	1,0	2,0	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7K+G109A+N280S+E391A	1,2	1,6	0,9	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7E+G109A+N280S+E391A	1,2	1,6	0,6	1,0
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7N+G109A+N280S+E391A	0,9	1,6	1,0	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7Q+G109A+N280S+E391A	1,6	1,6	1,1	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7L+G109A+N280S+E391A	1,6	1,6	1,4	1,3
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7D+G109A+N280S+E391A	1,9	1,6	1,5	1,3
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+K320A+E391A	0,4	0,9	1,0	1,3
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+K320M+E391A	1,5	1,1	1,8	1,3
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+K320T+E391A	1,3	1,1	1,5	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+K320V+E391A	1,0	0,9	1,7	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+M323R+E391A	0,7	0,9	1,3	1,0
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+K320S+E391A	1,8	1,3	1,8	1,3
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+E391V	1,3	1,1	2,0	1,3
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+W284R+E391A	1,2	1,3	1,2	1,2
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+W284F+E391A	1,7	1,3	1,8	1,2
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A	2,0	1,4	1,4	1,2
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+W284F+E391A	0,9	0,9	1,3	1,0
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+M323N+E391A	2,0	1,6	2,0	1,3
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+109+N280S+M323K+E391A	2,3	1,6	2,0	1,6
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109S+N280S+E391A	2,5	1,3	2,3	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+W284H+E391A	1,5	1,2	1,3	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,6	1,1	1,2	1,1
Id. de sec. n.º: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,5	1,4	1,2	1,2

Como se puede ver en la Tabla 1 y la Tabla 2, todas las variantes analizadas tienen una capacidad limpiadora mejorada en comparación con la referencia (Id. de sec. n.º: 2) en al menos una de las condiciones analizadas.

Ejemplo 2: Capacidad limpiadora de alfa-amilasas en detergente líquido K

La capacidad limpiadora de la variante analizada y la correspondiente alfa-amilasa original (Id. de sec. n.º: 2) se evaluaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados se proporcionan como (capacidad de la variante menos la capacidad del blanco) dividido por la (capacidad del precursor menos la capacidad del blanco).

Tabla 5: Capacidad limpiadora en la escala de LOM

	Detergente modelo HDL WE	
	IF	IF

	CS-28 HM	CS-29 HM
Referencia Id. de sec. n.º: 2	1,00	1,00
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G109A+W284H+E391A	1,28	1,58
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,13	1,61
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,22	2,02

Tabla 6: Capacidad limpiadora en la escala de LOM

1 l, 5 min de lavado 0,13 mg de proteína enzimática/l	Detergente modelo SUD WE	
	IF CS-29 HM	IF CS-26 HM
Referencia Id. de sec. n.º: 2	1,00	1,00
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G109A+W284H+E391A	1,00	1,00
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,08	1,11
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,10	1,13

Tabla 7: Capacidad limpiadora en el ensayo de la máquina de lavado a escala completa

Escala completa, 0,072 mg de proteína enzimática/l	Detergente modelo HDL NA	
	IF CS-29 HM	IF CS-26 HM
Referencia Id. de sec. n.º: 2	1,00	1,00
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G109A+W284H+E391A	1,07	1,02
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,22	1,32
Id. de sec. n.º: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,32	1,41

Método de uso

La presente invención incluye un método para limpiar y/o tratar un sitio entre otros una superficie o tejido. En un aspecto, dicho método comprende las etapas de lavar y/o enjuagar opcionalmente dicha superficie o tejido, poner en contacto dicha superficie o tejido con cualquier producto de consumo descrito en la presente memoria, y a continuación se describe en lavado y/o enjuagado opcional de dicha superficie o tejido.

En la presente memoria, el lavado incluye, pero no se limita a, restregado y agitación mecánica. El secado de dichas superficies o tejidos se puede llevar a cabo mediante uno de cualquiera de los medios habituales utilizados tanto en el campo doméstico como en el industrial. Dichos medios incluyen, aunque no de forma limitativa, secado con aire forzado o aire en reposo a temperaturas ambiente o elevadas a presiones entre 5 y 0,01 atmósferas en presencia o ausencia de radiación electromagnética, incluida la luz solar, irradiación infrarroja, ultravioleta y de microondas. En un aspecto, dicho secado se puede llevar a cabo a temperaturas mayores que la temperatura ambiente con una plancha en donde, por ejemplo, dicho tejido puede estar en contacto directo con dicha plancha por periodos cortos o incluso prolongados y en donde la presión se puede ejercer más allá de lo que estaría normalmente presente debido a la fuerza de la gravedad. En otro aspecto, dicho secado se puede llevar a cabo a temperaturas superiores a la ambiente empleando una secadora. Los aparatos para secar tejidos son bien conocidos, y frecuentemente se denominan como secadora de ropa. Además de las prendas de vestir, dichos aparatos se utilizan para secar otros muchos objetos incluidos toallas, sábanas, fundas de almohada, pañales y así sucesivamente y este equipo se ha aceptado como una comodidad de uso habitual en muchas naciones del mundo, sustituyendo esencialmente el uso de tendedores para secar tejidos. La mayoría de las secadoras que se utilizan en la actualidad utilizan aire caliente que se hace pasar sobre y por el tejido a medida que gira en el interior de la secadora. El aire se puede calentar, por ejemplo, bien electrónicamente, con una llama de gas, o incluso mediante radiación de microondas. Dicho aire se puede calentar de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 400 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 200 °C, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 100 °C, o incluso de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 85 °C y utilizarse en la secadora para secar una superficie y/o un tejido. Como apreciará el experto en la técnica, las composiciones limpiadoras de la presente invención resultan adecuadas de forma ideal para usar en aplicaciones de lavado de ropa. Por tanto, la presente invención incluye un método para lavar un tejido. El método comprende las etapas de poner en contacto un tejido que se va a lavar con una dicha solución limpiadora para lavado de ropa que comprende al menos una realización de composición limpiadora de los solicitantes, aditivo de limpieza o mezcla de los mismos. El tejido puede comprender la mayoría de los tejidos capaces de ser lavados en condiciones normales de uso por parte del consumidor o en instituciones públicas. La solución tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 10,5. Las composiciones pueden emplearse de forma típica a concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15.000 ppm, en solución. Las temperaturas

del agua están de forma típica en el intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 90 °C. La relación entre agua y tejido es de forma típica de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

Ejemplos de detergentes

Ejemplos 1-6

Composiciones detergentes para lavado de ropa granulares escogidas para lavado de ropa a mano o para lavadoras de ropa de carga por la parte superior.

	1 (% en peso)	2 (% en peso)	3 (% en peso)	4 (% en peso)	5 (% en peso)	6 (% en peso)
Alquilbencenosulfonato lineal	20	22	20	15	20	20
Dimetilhidroxietilo C ₁₂₋₁₄ cloruro de amonio	0,7	0,2	1	0,6	0,0	0
AE3S	0,9	1	0,9	0,0	0,5	0,9
AE7	0,0	0,0	0,0	1	0,0	3
Tripolifosfato de sodio	5	0,0	4	9	2	0,0
Zeolita A	0,0	1	0,0	1	4	1
Silicato 1,6R (SiO ₂ :Na ₂ O en una relación 1,6:1)	7	5	2	3	3	5
Carbonato sódico	25	20	25	17	18	19
Poliacrilato MW 4500	1	0,6	1	1	1,5	1
Copolímero de injerto aleatorio ¹	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Carboximetilcelulosa	1	0,3	1	1	1	1
Proteasa (Savinase®, 32,89 mg de sustancia activa/g)	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1
Lipasa - Lipex® (18 mg de sustancia activa/g)	0,03	0,07	0,3	0,1	0,07	0,4
*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	0,63	1,0	2,0	0,44	0,88	0,3
Abrillantador fluorescente 1	0,06	0,0	0,06	0,18	0,06	0,06
Abrillantador fluorescente 2	0,1	0,06	0,1	0,0	0,1	0,1
DTPA	0,6	0,8	0,6	0,25	0,6	0,6
MgSO ₄	1	1	1	0,5	1	1
Percarbonato de sodio	0,0	5,2	0,1	0,0	0,0	0,0
Perborato de sodio	4,4	0,0	3,85	2,09	0,78	3,63
Monohidrato						
NOBS	1,9	0,0	1,66	0,0	0,33	0,75
TAED	0,58	1,2	0,51	0,0	0,015	0,28
Ftalocianina de cinc sulfonatada	0,0030	0,0	0,0012	0,0030	0,0021	0,0
S-ACMC	0,1	0,0	0,0	0,0	0,06	0,0
Direct Violet 9	0,0	0,0	0,0003	0,0005	0,0003	0,0
Acid Blue 29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0003
Sulfato/humedad	Resto					

*La amilasa de la presente invención se muestra como mg de enzima activa por 100 g de detergente.

Ejemplos 7-12

Composiciones detergentes para lavado de ropa granulares escogidas para lavadoras automáticas de carga frontal.

	7 (% peso)	8 (% peso)	9 (% peso)	10 (% peso)	11 (% peso)	12 (% peso)
5	Alquilbencenosulfonato lineal	8	7,1	7	6,5	7,5
	AE3S	0	4,8	0	5,2	4
	Alquilsulfato C12-14	1	0	1	0	0
	AE7	2,2	0	3,2	0	0
10	Cloruro de dimetilhidroxietilamonio C ₁₀₋₁₂	0,75	0,94	0,98	0,98	0
	Silicato laminar cristalino (δ -Na ₂ Si ₂ O ₅)	4,1	0	4,8	0	0
	Zeolita A	5	0	5	0	2
15	Ácido cítrico	3	5	3	4	2,5
	Carbonato sódico	15	20	14	20	23
	Silicato 2R (SiO ₂ :Na ₂ O en una relación 2:1)	0,08	0	0,11	0	0
20	Agente para liberar la suciedad	0,75	0,72	0,71	0,72	0
	Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico	1,1	3,7	1,0	3,7	2,6
	Carboximetilcelulosa	0,15	1,4	0,2	1,4	1
	Proteasa - Purafect® (84 mg de sustancia activa/g)	0,2	0,2	0,3	0,15	0,12
25	Lipasa - Lipex® (18,00 mg de sustancia activa/g)	0,05	0,15	0,1	0	0
	Celulasa - Celluclean™ (15,6 mg de sustancia activa/g)	0	0	0	0	0,1
30	*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	4,0	2,0	1,0	0,7	6,0
	Amilasa ⁴	0,15	0,04	0,03	-	0,01
	TAED	3,6	4,0	3,6	4,0	2,2
35	Percarbonato	13	13,2	13	13,2	16
	Sal de sodio del ácido etilendiamin-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) (EDDS)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Hidroxietanodifosfonato (HEDP)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
40	MgSO ₄	0,42	0,42	0,42	0,42	0,4
	Perfume	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6
	Aglomerado de supresor de las jabonaduras	0,05	0,1	0,05	0,1	0,06
45	Jabón	0,45	0,45	0,45	0,45	0
	Ftalocianina de cinc sulfonada (sustancia activa)	0,0007	0,0012	0,0007	0	0
	S-ACMC	0,01	0,01	0	0,01	0
50	Direct Violet 9 (sustancia activa)	0	0	0,0001	0,0001	0
	Sulfato/Agua y Otras sustancias	Resto				

*La amilasa de la presente invención se muestra como mg de enzima activa por 100 g de detergente.

Ejemplos 13-18 Composiciones detergentes para lavado de ropa líquidas de limpieza intensiva

	13 (% peso)	14 (% peso)	15 (% peso)	16 (% peso)	17 (% peso)	18 (% peso)
55	Alquiletoxi(1,8)sulfato C ₁₂₋₁₅	14,7	11,6		16,31	17,29
60	Alquilbenceno sulfonato C _{11,8}	4,3	11,6	8,3	7,73	11,7
	Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	1,7	1,29		3,09	3,3
	Alquil C ₁₂₋₁₄₋₉ -etoxilado	0,9	1,07		1,31	1,31
	Óxido de dimetilamina C ₁₂	0,6	0,64		1,03	1,03
65	Ácido cítrico	3,5	0,65	3	0,66	2,27

	Ácido graso C ₁₂₋₁₈	1,5	2,32	3,6	1,52	0,82	1,52
	Borato sódico (Bórax)	2,5	2,46	1,2	2,53		2,53
5	Alquil C ₁₂₋₁₄ etoxi 3 sulfato sódico			2,9		3,9	
	Alquil C ₁₄₋₁₅ 7-etoxilado			4,2		1,9	
	Alquil C ₁₂₋₁₄ -7-etoxilado			1,7		0,5	
	Cloruro de Ca dihidratado					0,045	
	Formiato de Ca	0,09	0,09		0,09		0,09
10	Un compuesto: 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); n es de 20 a 30; x es de 3 a 8, opcionalmente sulfatado o sulfonado			1,2		0,66	
	Copolímero de injerto al azar ¹		1,46	0,5		0,83	
15	Polietilenimina etoxilada ²	1,5	1,29		1,44		1,44
	Ácido dietilentriamino pentaacético	0,34	0,64		0,34		0,34
	Ácido dietilentriaminapentametilenfosfónico			0,3		0,3	
	Ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico					0,18	
20	Hidrato de la sal disódica del ácido dihidroxibenceno-3,5-disulfónico						0,19
	Tinopal AMS-GX		0,06				0,29
	Tinopal CBS-X	0,2	0,17		0,29		
25	Tinopal TAS-X B36					0,091	
	Polímero limpiador de grasa alcoxilado anfifílico ³	1,28	1	0,4	1,93		1,93
	CHEC			0,2			
	Etanol	2	1,58	1,6	5,4	1,2	3,57
30	Propilenglicol	3,9	3,59	1,3	4,3		3,8
	Dietilenglicol	1,05	1,54		1,15		1,15
	Polietilenglicol	0,06	0,04		0,1		0,1
35	*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	15,0	10,0	5,0	8,0	4,25	11,7
	Amilasa ⁴	0,01	0,1	0,15	0,12	-	0,05
	Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4	1,26	0,31	1,13
	NaOH	2,44	1,8		3,01	3,84	0,24
40	Sulfonato de cumeno sódico			1		0,95	
	Formiato sódico		0,11		0,09	0,2	0,12
45	Agua, sustancias estéticas (colorantes, perfumes) y componentes minoritarios (enzimas que incluyen lipasa, proteasa, amilasa adicional, cada una a 0,2 % de proteína activa, disolventes, estructurantes)	Resto					

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

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

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

* La amilasa de la presente invención se muestra como mg de enzima activa por 100 g de detergente.

Ejemplos 19-21 Composición detergente para lavado de ropa líquido de limpieza intensiva

60		19 (% peso)	20 (% peso)	21 (% peso)
	Alquilbencenosulfonato sódico	21,0	10,2	3,53
	Alquil C ₁₂₋₁₈ 1,5-9-etoxilado	18,0	6,32	0,88
65	Alquilsulfato ramificado			2,44

	Alquiletoxi 1-3 sulfato sódico		1,17	14,81
	Ácido cítrico		3,14	2,05
	Óxido de dimetilamina C ₁₂			0,56
5	Ácido graso C ₁₂₋₁₈	15,0	2,59	1,48
	Proteasa (Purafect Prime®, 40,6 mg de componente activo/g)	1,5	0,52	1,64
	Mananasa (Mannaway®, 11 mg de componente activo/g)	0,1	0,06	
10	Xiloglucanasa (Whitezyme®, 20 mg de componente activo/g)	0,2	0,06	
	Lipasa (Lipex)	0,1	0,2	0,05
	*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	5,9	2,3	12,8
15	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, opcionalmente variantes sulfatadas o sulfonadas	2,0	0,63	
	Copolímero de injerto al azar ¹		1,07	
20	Polietilenimina etoxilada ²	0,8		1,51
	Polímero anfifílico alcoxilado ³			
	Amilasa ⁴			
	Quelante de tipo fosfonato	0,8	0,41	0,53
25	Hidrótropo		0,93	
	Abrillantador	0,2	0,09	0,19
	Tinte mordiente de tiofeno etoxilado	0,004		
30	Componentes minoritarios: tintes, perfume, microcápsulas de perfume, enzimas, estabilizadores de enzimas, disolventes, estructurantes, agentes modificadores del pH	Resto	Resto	Resto

* La amilasa de la presente invención se muestra como mg de enzima activa por 100 g de detergente.

** Basado en el peso de la composición total de limpieza y/o tratamiento, un total de no más del 7 % de agua.

35 Materias primas y notas para los Ejemplos de composición 1-21

Alquilbenceno sulfonato lineal con una longitud promedio de cadena de carbono alifática de C₁₁-C₁₈

Cloruro de dimetilhidroxiethylamonio C₁₂₋₁₈

40 AE3S es alquil C₁₂₋₁₅ etoxi (3) sulfato

AE7 es alcohol C₁₂₋₁₅ etoxilado, con un grado promedio de etoxilación de 7

45 AE9 es alcohol C₁₂₋₁₆ etoxilado, con un grado promedio de etoxilación de 9

HSAS es un alquilsulfato primario de ramificación intermedia con una longitud de cadena de carbono de aproximadamente 16-17 según se describe en US-6.020.303 y US-6.060.443

50 El poliacrilato PM 4500 es comercializado por BASF

La carboximetilcelulosa es Finnfix® V, comercializada por CPKelco, Arnhem, Países Bajos

CHEC es un polímero de hidroxietilcelulosa modificado catiónicamente.

55 Los quelantes de fosfonato son, por ejemplo, ácido dietilentetraaminapentaacético (DTPA) hidroxietano difosfonato (HEDP)

Savinase®, Natalase®, Stainzyme®, Lipex®, Celluclean™, Mannaway® y Whitezyme® son todos productos de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.

60 Purafect®, Purafect Prime® son productos de Genencor International, Palo Alto, California, EE. UU.

El abrillantador fluorescente 1 es Tinopal® AMS, el abrillantador fluorescente 2 es Tinopal® CBS-X, el Direct Violet 9 es Pergasol® Violet BN-Z, NOBS es nonanoiloxibencenosulfonato sódico

65 TAED es tetraacetiletilendiamina

La S-ACMC es carboximetilcelulosa conjugada con C.I. Reactive Blue 19, nombre de producto AZO-CM-CELLULOSE

El agente para liberar la suciedad es Repel-o-tex® PF

El copolímero ácido acrílico/ácido maleico tiene un peso molecular de 70.000 y una relación acrilato:maleato de 70:30

EDDS es una sal sódica del ácido etilendiamina-N,N'-disucínico, isómero (S,S), el supresor de las jabonaduras aglomerado está comercializado por Dow Corning, Midland, Michigan, EE. UU.

HSAS es alquilsulfato de ramificación intermedia

El Liquitint® Violet CT se comercializa por Milliken, Spartanburg, South Carolina, EE. UU.

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 anfífilo alcoxlado es una polietileneimina (PM 600), preparada a partir de un polímero que se ha derivatizado para contener 24 grupos etoxilato por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH.

Amilasa⁴ es cualquiera de a) a k) en la presente memoria (mg de proteína activa).

Ejemplos 22-26 Composiciones detergentes para lavado de ropa en dosis unitaria. Dichas formulaciones en dosis unitaria pueden comprender uno o varios compartimentos.

	22 (% peso)	23 (% peso)	24 (% peso)	25 (% peso)	26 (% peso)
Ácido alquilbenceno sulfónico	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
Alquil C ₁₂₋₁₈ etoxi 3 sulfato	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Alquil C ₁₂₋₁₈ 7-etoxilado	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0
Ácido cítrico	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Ácido graso	14,8	14,8	14,8	14,8	14,8
*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	6	12	8	2	10
Polietilenimina etoxilada ¹	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Proteasa (Purafect Prime®, 40,6 mg de sustancia activa/g)	1,4	2,0	0,9	1,2	0
Celulosa (Celluclean, proteína activa)	0,1	0,2			0,1
Amilasa ⁴ (proteína activa) a) a k) en la presente memoria	0,1	0,05	0,1	0,2	0,1
Ácido hidroxietano difosfónico	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Abrillantador	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
P-diol	15,8	13,8	13,8	13,8	13,8
Glicerol	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
MEA	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
TIPA	-	-	2,0	-	-
TEA	-	2,0	-	-	-
Sulfonato de cumeno	-	-	-	-	2,0
ciclohexildimetanol	-	-	-	2,0	-
Agua	10	10	10	10	10
Estructurante	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
Perfume	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Tampones (monoetanolamina)	Hasta pH 8,0				
Disolventes (1,2-propanodiol, etanol)	Hasta el 100 %				

*La amilasa de la presente invención se muestra como mg de enzima activa por 100 g de detergente.

¹ Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

Ejemplo 27 Composición en dosis unitaria multicompartimental

Se proporcionan a continuación formulaciones detergentes en dosis unitaria multicompartimental de la presente invención. En estos ejemplos, la dosis unitaria tiene tres compartimentos, pero se pueden preparar composiciones similares para dos, cuatro o cinco compartimentos. La película utilizada para encapsular los compartimentos es poli(alcohol vinílico).

Composición base 1	27 (% peso)
Glicerol (min 99)	5,3
1,2-propanodiol	10,0
Ácido cítrico	0,5
Monoetanolamina	10,0
Sosa cáustica	-
Dequest 2010	1,1
Sulfito potásico	0,2
*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	8,0
Marlipal no iónico C24EO7	20,1
HLAS	24,6
Abrillantador óptico FWA49	0,2
Ácido graso C12-15	16,4
Lutensit Z96 polimérico	2,9
Polietilenimina etoxilada PEI600 E20	1,1
MgCl2	0,2
Disolventes (1,2-propanodiol, etanol)	Hasta el 100 %

Formulaciones multicompartimentales

Composición	1			2		
Compartimento	A	B	C	A	B	C
Volumen de cada compartimento	40 ml	5 ml	5 ml	40 ml	5 ml	5 ml
Material activo en % en peso						
Perfume	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Tintes	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
TiO2	0,1	-	-	-	0,1	-
Sulfito sódico	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
Acusol 305	1,2			2	-	-
Aceite de ricino hidrogenado	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
Composición base 1	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %

* La amilasa de la presente invención se muestra como mg de enzima activa por 100 g de detergente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición limpiadora que comprende:

5 a) una variante de una alfa-amilasa original, en donde la variante comprende

(i) una modificación en una o más posiciones correspondientes a 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1, y opcionalmente en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 304 y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1,

(ii) dicha variante tiene al menos 80, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8,

(iii) dicha variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(iv) dicha variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:

X1*+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7K+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7E+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7N+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7Q+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7L+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7D+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320A+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320M+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320T+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320V+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X323R+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320S+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X391V;
 X1*+X109A+X284R+X391A;
 X1*+X109A+X284F+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X284F+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X323N+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X323K+X391A;
 X1*+X109S+X280S+X391A;
 X1*+X109A+X284H+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X284H+X320A+X323N+X391A;
 X7A+X284H+X320A+X323N;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X284H+X391A;
 X1*+X109A+X280S+X323S+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X323S+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X323N+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X284F+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X284R+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323S+X391A;
 X1*+X7A+X109A+X284R+X391A; y
 X1*+X7A+X109A+X280S+X320A+X323N+X391A.

b) un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9 % en peso.

2. Una composición según la reivindicación 1, en donde la modificación es una delección o una sustitución.

3. Una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde dicha variante comprende una modificación en al menos dos posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 280, 284, 320, 323 y 391 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 1.

4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicha variante comprende una modificación en al menos dos posiciones correspondientes a las posiciones 109, 1, 7, 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 243, 260, 280, 284, 304, 320, 323, 391 y 476 de la secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 1.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicha una o más modificaciones son sustituciones.
6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde al menos una de dichas una o más modificaciones es una delección.
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha variante comprende una modificación en al menos dos posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 1, 109 y 391.
8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde en la variante, dicha modificación o modificaciones se seleccionan del grupo que consiste en: X1*, X1A, X7A, X7K, X7E, X7N, X7Q, X7L, X7D, X109A, X109S, X140Y, X181*, X182*, X183*, X184*, X195F, X206Y, X243F, X260G, X280S, X284H, X284R, X284F, X304R, X320A, X320M, X320T, X320V, X320S, X323N, X323R, X323S, X323K, X391A, X391V y X476K.
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicha variante tiene una capacidad mejorada, tal como una capacidad limpiadora mejorada.
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicha variante tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa original.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde en la variante el número de modificaciones es de 1 a 30, o de 1 a 20, o de 1 a 10 o de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones.
12. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la variante comprende modificaciones en las posiciones seleccionadas del grupo de posiciones que consiste en: X1+X7; X1+X109; X1+X280; X1+X284; X1+X320; X1+X323; X1+X391; X109+X280; X109+X284; X109+X320; X109+X323; X109+X391; X7+X109; X7+X280; X7+X284; X7+X323; X7+X391; X280+X284; X280+X320; X280+X323; X280+X391; X284+X320; X284+X323; X284+X391; X320+X323; X320+X391; y X323+X391, en donde la numeración es según la Id. de sec. n.º: 1.
13. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Id. de sec. n.º: 2, seleccionadas del grupo que consiste en:
 - H1*+G109A+N280S+E391A;
 - H1*+G7K+G109A+N280S+E391A;
 - H1*+G7E+G109A+N280S+E391A;
 - H1*+G7N+G109A+N280S+E391A;
 - H1*+G7Q+G109A+N280S+E391A;
 - H1*+G7L+G109A+N280S+E391A;
 - H1*+G7D+G109A+N280S+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+K320A+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+K320M+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+K320T+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+K320V+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+M323R+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+K320S+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+E391V;
 - H1*+G109A+W284R+E391A;
 - H1*+G109A+W284F+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+W284F+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+M323N+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+M323K+E391A;
 - H1*+G109S+N280S+E391A;
 - H1*+G109A+W284H+E391A;
 - H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A;
 - H1*+G7A+G109A+N280S+E391A;

- H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+K320A+M323N+E391A;
G7A+W284H+K320A+M323N;
H1*+G7A+G109A+N280S+E391A;
H1*+G109A+N280S+W284H+E391A;
5 H1*+G109A+N280S+M323S+E391A;
H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+E391A;
H1*+G7A+G109A+N280S+M323S+E391A;
H1*+G7A+G109A+N280S+M323N+E391A;
H1*+G7A+G109A+N280S+W284F+E391A;
10 H1*+G7A+G109A+N280S+W284R+E391A;
H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A;
H1*+G7A+G109A+W284R+E391A; y
H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A.
- 15 14. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la alfa-amilasa original para la variante se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos expuestas en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, o cualquier alfa-amilasa que tenga al menos 90 %, tal como al menos 92 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.
- 20 15. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la alfa-amilasa original para la variante se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos expuestas en las Id. de sec. n.º: 1 o 2, o cualquier alfa-amilasa que tenga al menos 90 %, tal como al menos 92 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las Id. de sec. n.º: 1 o 2.
- 25 16. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante tiene al menos 85 %, al menos 87 %, al menos 90 %, al menos 95 % de identidad, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, pero menos de 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de cualquiera de las Id. de sec. n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, o en donde la variante de la alfa-amilasa original comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido maduro seleccionado de (i) Id. de sec. n.º: 1; (ii) Id. de sec. n.º: 2; (iii) Id. de sec. n.º: 3; (iv) Id. de sec. n.º: 4; (v) Id. de sec. n.º: 5; (vi) Id. de sec. n.º: 6; (vii) Id. de sec. n.º: 7; (viii) Id. de sec. n.º: 8.
- 30 17. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es una composición detergente para lavado de ropa líquida o una composición detergente en dosis unitaria.
- 35 18. Un método para tratar una superficie, preferiblemente un material textil, que comprende:
- 40 (i) formar una solución de lavado acuosa que comprende agua y una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores
- 45 (ii) tratar la superficie con la solución de lavado acuosa preferiblemente a una temperatura de 40 °C o menos, o más preferiblemente a una temperatura de 35 °C o menos, con máxima preferencia a una temperatura de 30 °C o menos; y (iii) enjuagar la superficie.