

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 963 486**

51 Int. Cl.:

C12N 9/26

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2018** **PCT/EP2018/052197**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2018** **WO18141707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2018** **E 18708589 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023** **EP 3577219**

54 Título: **Variantes de alfa-amilasa**

30 Prioridad:

01.02.2017 IN 201741003686
27.03.2017 EP 17163114

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.03.2024

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 963 486 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de alfa-amilasa

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a variantes de una alfa-amilasa, a polinucleótidos que codifican las variantes, a constructos de ácido nucleico, a vectores de expresión y a células huésped que comprenden un polinucleótido de la invención y a procedimientos para producir las variantes.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos 1,4-gluosídicos lineales y ramificados.

20 Existe una larga historia de uso industrial de alfa-amilasas en varias aplicaciones conocidas, tales como detergentes, panificación, elaboración de cerveza, licuefacción de almidón y sacarificación, por ejemplo en la preparación de jarabes con alto contenido de fructosa o como parte de la producción de etanol a partir de almidón. Estas y otras aplicaciones de las alfa-amilasas son conocidas y utilizan alfa-amilasas derivadas de microorganismos, en particular alfa-amilasas bacterianas.

25 Entre las primeras alfa-amilasas bacterianas que se utilizaron se encontraba una alfa-amilasa de *B.licheniformis*, también conocida como Termamyl, que se ha caracterizado ampliamente, y se ha determinado la estructura cristalina de esta enzima. Las amilasas alcalinas, tales como AA560, forman un grupo particular de alfa-amilasas que se utilizan en detergentes. Muchas de estas amilasas bacterianas conocidas se han modificado para mejorar su funcionalidad en una aplicación particular.

30 Las amilasas de *Bacillus*, tales como Termamyl, AA560 (documento WO 2000/060060) y SP707 (descrita por Tsukamoto et al., 1988, Biochem. Biophys. Res. Comm. 151: 25-31) forman un grupo particular de alfa-amilasas que se utilizan en detergentes. Estas amilasas se han modificado para mejorar su estabilidad en detergentes. El documento WO 96/23873, por ejemplo, divulga la eliminación de los aminoácidos 181+182 o de los aminoácidos 183+184 de SP707 (SEQ ID NO: 7 del documento WO 96/23873) para mejorar la estabilidad de esta amilasa. El documento WO 35 96/23873 divulga también la modificación de la amilasa SP707 mediante la sustitución de M202 por, por ejemplo, una leucina para estabilizar la molécula frente a la oxidación. Por lo tanto, se conoce la modificación de amilasas para mejorar determinadas propiedades.

40 Por motivos medioambientales cada vez es más importante reducir la temperatura en los procesos de lavado de ropa, de lavado de vajillas y/o de limpieza. No obstante, la mayor parte de las enzimas, incluidas las amilasas, tienen una temperatura óptima que es superior a la temperatura utilizada habitualmente en el lavado a baja temperatura. La alfa-amilasa es una enzima clave para su uso 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 de vajillas. Por lo tanto, es importante encontrar 45 variantes de alfa-amilasa que conserven su rendimiento de lavado, efecto quitamanchas y/o actividad cuando se reduce la temperatura. Sin embargo, a pesar de la eficacia de las composiciones enzimáticas de los detergentes actuales, existen muchas manchas que son difíciles de eliminar por completo. Estos problemas se ven agravados por el mayor uso de temperaturas de lavado bajas (por ejemplo, agua fría) y ciclos de lavado más cortos. Por tanto, es deseable disponer de enzimas amilolíticas que puedan actuar a baja temperatura y al mismo tiempo conservar o 50 aumentar otras propiedades deseables tales como actividad específica (actividad amilolítica), estabilidad y/o rendimiento de lavado.

El objetivo de la presente invención es proporcionar variantes de alfa-amilasa que tengan un rendimiento de lavado mejorado a baja temperatura en comparación con la alfa-amilasa progenitora de la SEQ ID NO: 2.

55 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una variante de una alfa-amilasa progenitora, en la que dicha variante comprende

60 (i) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones G109A y G7A de la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2,

(ii) dicha variante tiene al menos el 90%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2, y

65 (iii) dicha variante tiene actividad de alfa-amilasa,

en la que dicha variante tiene un rendimiento de lavado mejorado a una temperatura baja de entre 10-35 °C en comparación con la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica una variante según la invención, a un constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido que codifica la variante según la invención, a un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la variante según la invención, y a una célula huésped que comprende el polinucleótido que codifica la variante según la invención.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para producir una variante de alfa-amilasa, que comprende (a) cultivar la célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la variante, y (b) recuperar la variante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a variantes de una alfa-amilasa progenitora, en la que dicha variante comprende

(i) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones G109A y G7A de la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2,

(ii) dicha variante tiene al menos el 90%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2, y

(iii) dicha variante tiene actividad de alfa-amilasa,

en la que dicha variante tiene un rendimiento de lavado mejorado a una temperatura baja de entre 10-35 °C en comparación con la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2.

Definiciones

Variante alélica: La expresión "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica se produce de forma natural por medio de mutación y puede dar como resultado polimorfismo dentro de las 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.

El término "alfa-amilasa" (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1) constituye un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis de almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos 1,4-gluosídicos lineales y ramificados. Para los fines de la presente invención, la actividad de alfa-amilasa se determina según el procedimiento descrito en la sección Ejemplos.

El término "aminoácido", tal como se utiliza en el presente documento, incluye los veinte aminoácidos estándar codificados genéticamente y sus correspondientes estereoisómeros en la forma "D" (en comparación con la forma "L" natural), omega-aminoácidos y otros aminoácidos de origen natural, aminoácidos no convencionales (por ejemplo aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, etc.) y aminoácidos químicamente derivatizados. Se pueden obtener derivados químicos de uno o más aminoácidos mediante reacción con un grupo lateral funcional. Dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, las moléculas en las que se han derivatizado grupos amino libres para formar clorhidratos de amina, grupos *p*-toluenosulfonilo, grupos carboxibenzoxi, grupos *t*-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres metílicos y etílicos 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 los péptidos que contienen derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo: la prolina puede sustituirse por 4-hidroxiprolina; la lisina puede sustituirse por 5-hidroxilisina; la histidina puede sustituirse por 3-metilhistidina; la serina puede sustituirse por homoserina y la lisina por ornitina. Los derivados también incluyen péptidos que contienen una o más adiciones o eliminaciones siempre que se mantenga la actividad requerida. Otras modificaciones incluidas son la amidación, la acilación amino terminal (por ejemplo acetilación o amidación de ácido tioglicólico), carboxilamidación terminal (por ejemplo, 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 a menos que se indique explícitamente lo contrario. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los 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 una sola letra, correspondiente al nombre trivial del aminoácido convencional. En una forma de realización, los polipéptidos de la invención comprenden o consisten en L-aminoácidos.

El término "ADNc" significa una molécula de ADN que puede prepararse mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura empalmada obtenida a partir de una célula eucariota o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcripto de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa por medio de una serie de etapas, que incluyen corte y empalme, antes de aparecer como ARNm maduro empalmado.

El término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante. Los límites de la secuencia codificante generalmente están determinados por un marco de lectura abierto, que comienza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de detención tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de los mismos.

El término "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 exógena (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante o nativa o exógena entre sí. Dichas secuencias de control incluyen, pero sin limitación, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, 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 transcripcionales y traduccionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligación de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

Los términos "rendimiento de lavado potenciado" o "rendimiento de lavado mejorado" significan la capacidad del polipéptido de la invención para proporcionar un efecto de limpieza (por ejemplo eliminación de manchas) en un proceso de lavado, tal como lavado de ropa o lavado de vajillas, mejorado en comparación con el de la alfa-amilasa progenitora de la SEQ ID NO: 2. El rendimiento de lavado se puede determinar mediante el uso de procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como el uso de un ensayo de estrés mecánico automático (AMSA). Los expertos en la técnica apreciarán que el rendimiento de lavado mejorado se puede lograr solo en algunas o quizás en todas las condiciones de lavado, por ejemplo a temperaturas de lavado de 20 °C o superiores (tal como a 40 °C).

El término "beneficio de detergencia enzimática" utilizado en el presente documento 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 poca o ninguna suciedad visible después del lavado y/o la limpieza, la prevención o la reducción de la redeposición de suciedad desprendida en el proceso de lavado (un efecto que también se denomina anti-redeposición), la restauración total o parcial de la blancura a materiales textiles que originariamente eran blancos pero que tras repetidos usos y lavados han adquirido un aspecto grisáceo o amarillento (efecto que también se denomina blanqueamiento). Los beneficios para el cuidado de materiales textiles que no están directamente relacionados con la eliminación catalítica de manchas o la prevención de la redeposición de suciedad, también son importantes para los beneficios de detergencia enzimática. Ejemplos de dichos beneficios para el cuidado de materiales textiles son la prevención o la reducción de la transferencia de tinte de un tejido a otro tejido o a otra parte del mismo tejido (un efecto que también se denomina inhibición de la transferencia de tinte o antirretrotinción), la eliminación de fibras que sobresalen o rotas de una superficie del tejido para disminuir la tendencia al frisado o eliminar las bolitas o pelusas ya existentes (un efecto que también se denomina antifrisado), la mejora de la suavidad del tejido, el aclaramiento del color del tejido y la eliminación de suciedad en partículas que queda atrapada en las fibras del tejido o la prenda. El blanqueo enzimático es un beneficio adicional de detergencia enzimática en el que la actividad catalítica generalmente se usa para catalizar la formación de un componente blanqueador tal como peróxido de hidrógeno u otros peróxidos.

El término "expresión" incluye cualquier etapa involucrada en la producción de una variante que incluye, pero sin limitación, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

El término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está operativamente unido a secuencias de control que proporcionan su expresión.

El término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del extremo amino y/o carboxilo terminal del polipéptido de la SEQ ID NO: 2; en el que el fragmento presenta actividad de alfa-amilasa.

El término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción o similares con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprenda un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

El término "valor de intensidad", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la medición del rendimiento de lavado. 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 está manchada, la intensidad de la luz reflejada es inferior a la de una muestra

limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada se puede utilizar para medir el rendimiento de lavado, correlacionándose un valor de intensidad más elevado con un rendimiento de lavado más elevado. Las mediciones de color se realizan con un escáner de superficie plana profesional (Kodak iQsmart, Kodak) utilizado para capturar una imagen del material textil lavado. Para extraer un valor de intensidad de la luz a partir de las imágenes escaneadas, los valores de píxeles de 24 bits de la imagen se convierten en valores de rojo, verde y azul (RGB). El valor de la intensidad (Int) se calcula sumando los valores RGB como vectores y después tomando la longitud del vector resultante:

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

Los términos "intensidad Delta" o "valor de intensidad Delta" se definen en el presente documento como el resultado de una medición de la intensidad de un material de ensayo, por ejemplo 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 porción de la muestra, lavada en condiciones idénticas, como fondo. La intensidad delta es el valor de la intensidad del material de ensayo lavado con amilasa menos el valor de la intensidad del material de ensayo lavado sin amilasa.

El término "propiedad mejorada", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una característica asociada con una variante que se mejora en comparación con el progenitor. Dichas propiedades mejoradas incluyen, pero sin limitación, rendimiento de lavado, actividad térmica, termoestabilidad y estabilidad en condiciones de almacenamiento y estabilidad química. La propiedad mejorada puede ser cualquiera de las definidas y descritas en el presente documento, tal como la estabilidad.

El término "rendimiento de lavado mejorado", tal se define en el presente documento, significa que muestra una alteración del rendimiento de lavado de una amilasa de la presente invención con respecto al rendimiento de lavado de la amilasa de la SEQ ID NO: 2. La alteración puede, por ejemplo, observarse como una mayor eliminación de manchas. El rendimiento de lavado mejorado se determina según el ejemplo 1. El rendimiento de lavado mejora si el factor de mejora (IF) se encuentra por encima de 1,0, preferentemente por encima de 1,05 en una o más de las condiciones enumeradas en el ejemplo 1, ya sea en el detergente modelo A a 20 °C en el que la concentración de la variante de alfa-amilasa es de 0,2 mg/l, o en el detergente modelo A a 40 °C en el que la concentración de la variante de alfa-amilasa es de 0,05 mg/l, o en el detergente modelo J a 20 °C en el que la concentración de la variante de alfa-amilasa es de 0,2 mg/l, o en el detergente modelo J a 30 °C en el que la concentración de la variante de alfa-amilasa es de 0,05 mg/l o en el detergente K a 20 °C en el que la concentración de la variante de alfa-amilasa es de 0,2 mg/l. Las condiciones de lavado se describen en la sección Ejemplos.

El término "rendimiento de lavado" incluye la limpieza en general, por ejemplo la limpieza de superficies duras tal como en el lavado de vajillas, pero también el rendimiento de lavado en materiales textiles tal como en el lavado de ropa, y también limpieza industrial e institucional. El rendimiento de lavado mejorado se puede medir mediante comparación de las intensidades delta tal como se describe en la definición del presente documento.

El término "aislado" significa una sustancia en una forma o un entorno que no se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos no limitantes de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no sea de origen natural, (2) cualquier sustancia, incluidas, pero sin limitación, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se retire al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los que está asociado en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada artificialmente con respecto a esa sustancia tal como se encuentra en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los que está asociada de forma natural (por ejemplo, múltiples copias de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor asociado de forma natural 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.

Polinucleótido aislado: El término "polinucleótido aislado" significa un polinucleótido modificado por la mano del hombre. En un aspecto, el polinucleótido aislado tiene al menos el 1% de pureza, por ejemplo, al menos el 5% de pureza, al menos el 10% de pureza, al menos el 20% de pureza, al menos el 40% de pureza, al menos el 60% de pureza, al menos el 80% de pureza, al menos el 90% de pureza y al menos el 95% de pureza, según se determina por electroforesis en 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 modificada por la mano del hombre. En un aspecto, la variante aislada tiene al menos el 1% de pureza, por ejemplo, al menos el 5% de pureza, al menos el 10% de pureza, al menos el 20% de pureza, al menos el 40% de pureza, al menos el 60% de pureza, al menos el 80% de pureza y al menos el 90% de pureza, según se determina por SDS-PAGE.

Baja temperatura: "Baja temperatura" es una temperatura de 5-40 °C, preferentemente 5-35 °C, preferentemente 5-30 °C, de forma más preferida 5-25 °C, de forma más preferida 5-20 °C, de la forma más preferida 5-15 °C, y en

particular 5-10 °C. En una forma de realización preferida, "baja temperatura" es una temperatura de 10-35 °C, preferentemente 10-30 °C, o 10-25 °C, o 10-20 °C, o 10-15 °C.

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

El término "secuencia codificante de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de alfa-amilasa.

El término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

El término "mutación", en el contexto de los polipéptidos de la invención, significa que uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de referencia (es decir, la SEQ ID NO:1) están alterados mediante sustitución por un aminoácido diferente o mediante eliminación. Además, la mutación puede corresponder a una inserción de uno o más aminoácidos adicionales dentro de la secuencia de aminoácidos de referencia.

El término "constructo de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, ya sea monocatenaria o bicatenaria, que se aísla de un gen natural o se modifica de forma que contenga segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control. El término constructo de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

El término "unido operativamente" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante.

El término "progenitor" o "alfa-amilasa progenitora" significa una alfa-amilasa a la que se le realiza una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido de origen natural (tipo silvestre) o una variante del mismo. Por ejemplo, el progenitor puede ser la alfa-amilasa de la SEQ ID NO: 1 (conocida como SP722). Alternativamente, también puede significar la alfa-amilasa de la SEQ ID NO: 2.

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, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferentemente la versión 5.0.0 o una posterior. Los parámetros utilizados pueden ser una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "la identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se utiliza como porcentaje de identidad y se calcula de la forma siguiente:

$$(\text{Identical Residues} \times 100) / (\text{Length of Alignment} - \text{Total Number of Gaps in Alignment})$$

Alternativamente, los parámetros utilizados pueden ser una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "la identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se utiliza como porcentaje de identidad y se calcula de la forma siguiente:

$$(\text{Identical Deoxyribonucleotides} \times 100) / (\text{Length of Alignment} - \text{Total Number of Gaps in Alignment})$$

Proceso de eliminación de almidón: La expresión "proceso de eliminación de almidón" se refiere a cualquier tipo de proceso mediante el cual se elimina (o se convierte) el almidón, tal como en los procesos de lavado en los que se elimina el almidón de materiales textiles, por ejemplo limpieza de materiales textiles tal como lavado de ropa. Un proceso de eliminación de almidón también podría ser la limpieza de superficies duras tales como el lavado de vajillas, o podrían ser procesos de limpieza en general, tales como limpieza industrial o institucional. La expresión también comprende otros procesos de eliminación de almidón o conversión de almidón, producción de etanol, licuación de almidón, desencolado de materiales textiles, producción de papel y pulpa, elaboración de cerveza y detergentes en general.

Polinucleótido sustancialmente puro: El término "polinucleótido sustancialmente puro" significa una preparación de polinucleótidos desprovista de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de polipéptidos modificados genéticamente. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo el 10%, como máximo el 8%, como máximo el 6%, como máximo el 5%, como máximo el 4%, como máximo el 3%, como máximo el 2%, como máximo el 1%, y como máximo el 0,5% en peso de otro material polinucleotídico con el que esté asociado de forma nativa o recombinante. Sin embargo, un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro tenga al menos el 90% de pureza, por ejemplo, al menos el 92% de pureza, al menos el 94% de pureza, al menos el 95% de pureza, al menos el 96% de pureza, al menos el 97% de pureza, al menos el 98% de pureza, al menos el 99% de pureza y al menos el 99,5% de pureza en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferentemente en una forma sustancialmente pura.

Variante sustancialmente pura: El término "variante sustancialmente pura" significa una preparación que contiene como máximo el 10%, como máximo el 8%, como máximo el 6%, como máximo el 5%, como máximo el 4%, como máximo el 3%, como máximo el 2%, como máximo el 1%, y como máximo el 0,5% en peso de otro material polipeptídico con el que esté asociado de forma nativa o recombinante. Preferentemente, la variante tiene al menos el 92% de pureza, por ejemplo, al menos el 94% de pureza, al menos el 95% de pureza, al menos el 96% de pureza, al menos el 97% de pureza, al menos el 98% de pureza, al menos el 99% de pureza, al menos el 99,5% de pureza y el 100% de pureza en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Las variantes de la presente invención están preferentemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando la variante mediante procedimientos recombinantes bien conocidos o mediante procedimientos de purificación clásicos.

El término "subsecuencia" significa un polinucleótido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante de polipéptido maduro; en el que la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad de alfa-amilasa.

Material textil: La muestra de material textil CS-28 (almidón de arroz sobre algodón) se obtiene de Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos.

El término "beneficios del cuidado de materiales textiles", tal como se utiliza en el presente documento, se define de forma que no está directamente relacionado con la eliminación catalítica de manchas o la prevención de la redeposición de suciedad, y también es importante para los beneficios de detergencia enzimática. Ejemplos de dichos beneficios del cuidado de materiales textiles son la prevención o la reducción de la transferencia de tinte de un material textil a otro material textil o a otra parte del mismo material textil (un efecto que también se denomina inhibición de la transferencia de tinte o antirretroinción), la eliminación de fibras que sobresalen o rotas de una superficie del material textil para disminuir la tendencia al frisado o eliminar las bolitas o pelusas ya existentes (un efecto que también se denomina antifrisado), la mejora de la suavidad del material textil, el aclaramiento del color del material textil y la eliminación de suciedad en partículas que queda atrapada en las fibras del material textil. El blanqueo enzimático es un beneficio adicional de detergencia enzimática en el que la actividad catalítica generalmente se usa para catalizar la formación de un componente blanqueador tal como peróxido de hidrógeno u otros peróxidos u otras especies blanqueadoras.

El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de alfa-amilasa que comprende una mutación, es decir, una sustitución, inserción y/o eliminación, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones relativas a la alfa-amilasa 'progenitora' de la SEQ ID NO: 1 o las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una eliminación significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de un aminoácido de forma adyacente al aminoácido que ocupa una posición e inmediatamente después del mismo. Las variantes de la presente invención tienen al menos el 20%, por ejemplo, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 100% de la actividad de alfa-amilasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

La expresión alfa-amilasa de "tipo silvestre" significa una alfa-amilasa expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, levadura u hongo filamentoso que se encuentra en la naturaleza.

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*, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 1

HHNGTNGTMMQYFEWHLPNDBGNHWNRLRDDASNLRNRGITAIWIPPAWKGT SQNDVGYGAY
 DLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLESIAIHALKNNGVQVYGDVVMNHKGGADATENVLAVEVN
 PNNRNQEISGDYITAEWTKFDFPGRGNTYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNRIFYKFRGDG
 KAWDWEVDSENGNYDYLMYADVMDHPEVVNELRRWGEWYTNTLNLDGFRIDAVKHIIKYSF
 TRDWLTHVRNATGKEMFAVAEFWKNDLGALENYLNKTNWNHVSFVDVPLHYNLYNASNSGGN
 YDMAKLLNGTVVQKHPMHA VTFVDNHDSQPGESLESFVQEWFKPLAYALILTREQGYPSVIFY
 GDYYGIPTHSVPAMKAKIDPILEARQNFAYGTQHDYFDHHNIIGWTREGNTTHPNSGLATIMSD
 GPGGEKWMYVGQNKAGQVWH DITGNKPGTVTINADGWANFSVNGGSGSVIWK R

Para los fines de la presente invención, el polipéptido divulgado en la SEQ ID NO: 1 se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido de alfa-amilasa. Sin embargo, el experto reconocerá que la secuencia de la SEQ ID NO: 2 también se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido de alfa-amilasa. La secuencia de aminoácidos de otra alfa-amilasa está alineada con el polipéptido maduro divulgado en la SEQ ID NO: 1, y basándose en el alineamiento, el número de posición de aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro divulgado en la SEQ ID NO: 1 se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferentemente la versión 5.0.0 o una posterior. Los parámetros utilizados son una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra alfa-amilasa puede determinarse mediante un alineamiento de múltiples secuencias polipeptídicas usando varios programas informáticos que incluyen, pero sin limitación, MUSCLE (comparación de múltiples secuencias por expectativa log; 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 et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900), y EMBOSS EMMA empleando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), utilizando sus respectivos parámetros por defecto.

Cuando la otra alfa-amilasa ha divergido del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 de manera que la comparación tradicional basada en secuencias no detecta su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), se pueden utilizar otros algoritmos de comparación de secuencias por pares. Se puede lograr una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias (perfiles) de polipéptidos para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda de base de datos iterativo, y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Se puede lograr una sensibilidad incluso mayor si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas. Programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una diversidad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructuras secundarias, perfiles de alineamiento estructural y potenciales de solvatación) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural para una secuencia de consulta. Del mismo modo, el procedimiento de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, se puede utilizar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP. Estos alineamientos, a su vez, pueden usarse para generar modelos de homología para el polipéptido, y la precisión de este tipo de modelos puede evaluarse usando una diversidad de herramientas desarrolladas con ese propósito.

Para proteínas de estructura conocida, se encuentran disponibles varias herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas SCOP se han alineado estructuralmente y esos alineamientos están accesibles y pueden descargarse. Se pueden alinear dos o más estructuras de proteínas utilizando una diversidad de algoritmos tales como la matriz de alineamiento de distancias (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o la extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos también se puede utilizar para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm y Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

Al describir las variantes de alfa-amilasa de la presente invención, la nomenclatura descrita a continuación se adapta para facilitar la referencia. Se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o de tres letras aceptada por la IUPAC.

Sustituciones. Para una sustitución de aminoácidos se usa la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. En consecuencia, la sustitución de, por ejemplo, treonina en la posición 226 por alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples están separadas por marcas de adición ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411F", que representan sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) por arginina (R) y serina (S) por fenilalanina (F), respectivamente.

Eliminaciones. Para una eliminación de aminoácidos se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, *. En consecuencia, la eliminación de, por ejemplo, glicina en la posición 181 se designa como "Ser181*" o "S181*". Las eliminaciones múltiples se separan por marcas de adición ("+"), por ejemplo, "Ser181* + Thr182*" o "S181* + T182*".

Inserciones. Para una inserción de aminoácidos se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. En consecuencia, la inserción de lisina después de, por ejemplo, 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 N° 1 insertado, aminoácido N° 2 insertado; 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 o los residuos de aminoácidos insertados se numeran mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácido que precede al o a los residuos de aminoácidos insertados. En el ejemplo anterior, por tanto, la secuencia sería:

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

Modificaciones múltiples. Las variantes que comprenden modificaciones múltiples están separadas por marcas de adición ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E" representan una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 por tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

Modificaciones diferentes. En los casos en los que se pueden introducir diferentes alteraciones en una posición, las diferentes alteraciones se separan con una coma, por ejemplo "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 por tirosina o ácido glutámico. Así, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las siguientes variantes:

"Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Alfa-amilasas progenitoras

La alfa-amilasa progenitora puede ser un polipéptido con al menos el 90% de identidad de secuencia con el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, la alfa-amilasa progenitora tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 de al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99 o el 100%, que tiene actividad de alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa progenitora difiere en no más de diez aminoácidos, por ejemplo en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos y en un aminoácido del polipéptido de la SEQ ID NO: 2.

La alfa-amilasa progenitora comprende o consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En otra forma de realización, la alfa-amilasa progenitora es una variante alélica del polipéptido de la SEQ ID NO: 2.

El progenitor puede obtenerse a partir de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de", tal como se utiliza en el presente documento, con respecto a una fuente determinada, significará que el progenitor codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una célula en la que se ha insertado el polinucleótido a partir de la fuente. En un aspecto, el progenitor se secreta de forma extracelular.

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

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

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

Se entenderá que para las especies mencionadas anteriormente, la invención abarca tanto el estado perfecto como el imperfecto, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que se les conoce. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

Las cepas de estas especies están fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivos, tales como American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

El progenitor puede identificarse y obtenerse de otras fuentes, incluidos microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, suelo, compost, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, suelo, compost, agua, etc.) mediante las sondas mencionadas anteriormente. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. El polinucleótido que codifica un progenitor puede derivarse entonces mediante el cribado similar de una biblioteca genómica o de ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mixta. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica un progenitor con una(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, anteriormente).

El progenitor puede ser un polipéptido híbrido en el que una porción de un polipéptido está fusionada en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de una porción de otro polipéptido.

El progenitor también puede ser un polipéptido fusionado o un polipéptido de fusión escindible en el que un polipéptido está fusionado en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal 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 se conocen en la técnica e incluyen la ligación de las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en marco y que la expresión del polipéptido fusionado se encuentre bajo el control del o de los mismos promotores y terminador. Las proteínas de fusión también se pueden construir utilizando tecnología de inteína en la que las fusiones se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

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. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero sin limitación, los sitios descritos por Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

Variantes

La presente invención proporciona variantes de una alfa-amilasa progenitora, en la que dicha variante comprende

(i) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones G109A y G7A de la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2,

(ii) dicha variante tiene al menos el 90%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2, y

(iii) dicha variante tiene actividad de alfa-amilasa,

en la que dicha variante tiene un rendimiento de lavado mejorado a una temperatura baja de entre 10-35 °C en comparación con la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2.

En una forma de realización, la variante tiene al menos el 95%, tal como al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% y al menos el 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

- 5 En una forma de realización, el número de modificaciones en las variantes de la presente invención es de 1 a 20, por ejemplo, 1 a 10 y 1 a 5, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones.

En una forma de realización preferida, la variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, seleccionadas del grupo que consiste en:

- 10 H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+K320A+M323N+E391A;
H1*+G7A+G109A+N280S+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; H1*+G7A+G109A+N280S+W284R+E391A;
15 H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A; H1*+G7A+G109A+W284R+E391A; y
H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A.

- En una forma de realización, la invención se refiere a variantes de la SEQ ID NO: 2 que comprenden las modificaciones correspondientes a H1*+G7A+G109A+N280S+E391A; y H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+M323N+E391A, en las que la numeración corresponde a la SEQ ID NO: 1, y en las que la variante tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.
- 20

- En una forma de realización, la variante de 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 forma de realización particular, la variante de 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. En una forma de realización preferida, la variante según la invención comprende además sustituciones en dos, tres o cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304R, W140YF, E260GHIKNPRTY y G476EQRK. En una forma de realización más preferida, las sustituciones en las posiciones dos, tres o cuatro se seleccionan del grupo que consiste en G304R, W140Y, E260G y G476K.
- 25
- 30

En una forma de realización, la variante de la invención comprende las modificaciones correspondientes a

- 35 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,

- 40 en las que la numeración corresponde a la SEQ ID NO: 1, teniendo la variante al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, y es una variante de la SEQ ID NO: 1

- Los aminoácidos esenciales en un progenitor pueden identificarse según procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones de una única alanina en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se someten a ensayo para determinar la actividad de alfa-amilasa para identificar los residuos de aminoácidos que son cruciales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la alfa-amilasa u otra interacción biológica también puede determinarse mediante análisis físico de la estructura, tal como mediante determinación con técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcado de fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. Las identidades de los aminoácidos esenciales también se pueden inferir a partir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con el progenitor.
- 45
- 50
- 55

Polinucleótidos

La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las variantes de la presente invención.

- 60

Constructos de ácidos nucleicos

La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. En una forma de realización, los constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención están operativamente unidos a una

- 65

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 procedimientos 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 en 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, ya sean homólogos o heterólogos de la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos 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 levansacarasa de *Bacillus subtilis* (sacB), los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, el operón lac de *E. coli*, el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA) y el gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Se describen otros promotores en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, anteriormente.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped de un hongo filamentoso son los promotores obtenidos de los genes de acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (glaA), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum* (documento WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, betaglucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, engoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado que incluye un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en *Aspergilli* en el que el líder no traducido se ha reemplazado por un líder no traducido de un gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; los ejemplos no limitantes 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 reemplazado 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 enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos et al., 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 operativamente unida al extremo 3' del polinucleótido que codifica la variante. Puede usarse cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped.

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

Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Romanos et al., 1992, anteriormente, describen otros terminadores útiles para células huésped de levadura.

La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte de la célula huésped. La secuencia líder está operativamente unida al

extremo 5' del polinucleótido que codifica la variante. Puede usarse cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped.

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

Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y 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. Puede usarse cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped.

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

Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levaduras se describen por Guo y Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* 15: 5983-5990.

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

Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes de péptidos señal obtenidas a partir de los genes de amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 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*. Otros péptidos señal se describen por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

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

Los péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y de invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptidos señal útiles se describen por Romanos et al., 1992, anteriormente.

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

Cuando tanto las regiones del péptido señal como del propéptido están presentes en el extremo N-terminal de una variante, la región del propéptido se coloca junto al extremo N-terminal de la variante y la región del péptido señal se coloca junto al extremo N-terminal 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 procarióticos incluyen los sistemas operadores lac, tac y trp. En levaduras se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se pueden 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 aquellas que permiten la amplificación de genes. 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 metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante estaría operativamente unido con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención. En una forma de realización, los vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención comprenden un promotor y señales de detención 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 la sustitución del polinucleótido que codifica la variante en dichos sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar insertando el polinucleótido o un 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 localiza en el vector de modo que la secuencia codificante esté unida operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir 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, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el o los cromosomas en los que se ha integrado. Además, se puede usar un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

El vector comprende preferentemente uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o virus, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

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

El vector comprende preferentemente 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 mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una o varias ubicaciones precisas en el o los cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tales 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 la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no 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 comprender además un origen de replicación que permita que el vector se replique de forma autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de la replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que medie la replicación autónoma que funcione en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" 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. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador

seleccionable amplificable con el polinucleótido en células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y de este modo se pueden seleccionar copias adicionales del polinucleótido cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

- 5 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, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, anteriormente) para obtener variantes sustancialmente puras.

Células huésped

- 10 La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención. En una forma de realización, las células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, están unidas operativamente a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención. Se introduce un constructo o vector que comprende un polinucleótido en una célula huésped de manera que el constructo o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante tal como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora 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.

- 20 La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procarionte o una eucariota.

- 25 La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero sin limitación, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero sin limitación, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

- 30 La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*, incluidas, pero sin limitación, células 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* y *Bacillus thuringiensis*.

- 35 La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, incluidas, pero sin limitación, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

- 40 La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* cell, incluidas, pero sin limitación, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

- 45 La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, verse afectada por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede, por ejemplo, verse afectada por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede, por ejemplo, verse afectada por transformación de protoplastos y electroporación (véase, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praga) 49: 399-405), o por conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o por transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, verse afectada por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397), o por conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede, por ejemplo, verse afectada por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), o por electroporación (véase, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804), o por conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). No obstante, se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.

La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta u hongo.

- 65 Las células fúngicas se pueden transformar mediante un procedimiento que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida de por sí.

Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238023 y por Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474. Procedimientos adecuados para transformar especies de *Fusarium* se describen por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y el documento WO 96/00787. La levadura puede transformarse usando 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, páginas 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Procedimientos de producción

La presente invención también se refiere a procedimientos para producir una variante, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped de la presente invención en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante. Por consiguiente, la presente invención se refiere a procedimientos para producir una variante, que comprenden (a) cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión o una variante que codifica un 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 SEQ ID NO: 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 expuesta en la SEQ ID NO: 1, en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una variante de alfa-amilasa, que comprende introducir en una alfa-amilasa progenitora una modificación en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 109, 7, 1, 391, 280, 284, 320 y 323 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 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 expuesta en la SEQ ID NO: 1, en el que cada modificación es independientemente una sustitución o eliminación, y la variante tiene actividad de alfa-amilasa; y recuperar la variante.

Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede cultivarse mediante cultivo en matraz con agitación, o fermentación a pequeña o gran escala (incluidas fermentaciones continuas, por lotes, por lotes alimentados o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales operados en un medio adecuado y en condiciones que permitan que el polipéptido se exprese y/o se aísle. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante se secreta en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no se secreta, se puede recuperar de los lisados celulares.

La variante puede detectarse usando procedimientos conocidos en la técnica que son específicos para las variantes. Estos procedimientos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad de la variante.

La variante puede recuperarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante puede recuperarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales, incluidos, pero sin limitación, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

La variante puede purificarse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, incluidos, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, hidrófoba, de cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, 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 se utiliza como fuente de la variante una célula huésped de la presente invención que expresa una variante.

Composiciones

Una variante de la invención puede estar comprendida en composiciones enriquecidas en dicha variante. El término "enriquecido" significa que la actividad de alfa-amilasa de la composición ha aumentado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de 1,1.

La composición puede comprender una variante de la invención como componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades

- enzimáticas, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanas. La o las enzimas adicionales pueden producirse, por ejemplo, por un microorganismo que pertenece al género *Bacillus*, por ejemplo *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*, o al género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, por ejemplo, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, por ejemplo, *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.
- Las composiciones pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de granulado o microgranulado. La variante puede estabilizarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.
- Las variantes de alfa-amilasa de la invención anteriores normalmente pueden ser un componente en una composición de limpieza, tal como una composición detergente, por ejemplo, una composición detergente para lavado de ropa o una composición detergente para lavado de vajillas. Se prefiere especialmente una composición detergente líquida para lavado de ropa.
- Dichas composiciones de limpieza comprenden un complemento limpiador/detergente, preferentemente una mezcla de componentes. Normalmente, el complemento de limpieza estará presente en la composición en una cantidad del 0,001 al 99,9% en peso, más típicamente del 0,01 al 80% en peso de complemento de limpieza.
- La composición puede comprender uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónicos, incluidos semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o iónicos dipolares y/o anfólicos y/o semipolares no iónicos y/o mezclas de los mismos. Los tensioactivos normalmente están presentes en un nivel del 0,1% al 60% en peso o del 0,5 al 50% en peso o del 1 al 40% en peso de la composición.

Usos

- Las variantes de alfa-amilasa de la invención son útiles en composiciones detergentes, procesos de lavado de ropa, de lavado de vajillas y/o de limpieza a baja temperatura.

Procedimiento de uso

- Las variantes de alfa-amilasa de la invención se pueden usar en procedimientos para limpiar y/o tratar un sitio, entre otros, una superficie o un tejido. En un aspecto, dicho procedimiento 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 divulgado en la presente memoria descriptiva y después, opcionalmente, lavar y/o enjuagar dicha superficie o tejido.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el lavado incluye, pero sin limitación, restregado y agitación mecánica. El secado de dichas superficies o tejidos se puede realizar mediante uno cualquiera de los medios comunes empleados en entornos domésticos o industriales. Dichos medios incluyen, pero sin limitación, secado con aire forzado o aire en reposo a temperaturas ambiente o elevadas a presiones de entre 5 y 0,01 atmósferas en presencia o ausencia de radiación electromagnética, incluidas la luz solar e irradiación infrarroja, ultravioleta y de microondas. En un aspecto, dicho secado se puede realizar a temperaturas superiores a la temperatura ambiente empleando una plancha en el que, por ejemplo, dicho tejido puede estar en contacto directo con dicha plancha durante periodos de tiempo relativamente cortos o incluso prolongados y en el que se puede ejercer una presión superior a la que de otro modo se produciría normalmente debido a la fuerza de la gravedad. En otro aspecto, dicho secado se puede realizar a temperaturas superiores a la temperatura ambiente empleando una secadora. Los aparatos para secar tejidos son bien conocidos y frecuentemente se les denomina secadoras. Además de la ropa, estos aparatos se utilizan para secar muchos otros artículos, incluidas toallas, sábanas, fundas de almohadas, pañales, etc., y dichos equipos han sido aceptados como una comodidad estándar en muchas naciones del mundo, reemplazando sustancialmente el uso de tendedores para el secado de tejidos. La mayor parte de las secadoras que se utilizan hoy en día utilizan aire caliente que pasa sobre el tejido o a través del mismo mientras este gira dentro de la secadora. El aire se puede calentar, por ejemplo, electrónicamente, mediante llama de gas o incluso con 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 se utiliza en la secadora para secar una superficie y/o un tejido. Como apreciará un experto en la técnica, las composiciones de limpieza de la presente invención son ideales para su uso en aplicaciones de lavado de ropa. En consecuencia, la presente invención incluye un procedimiento para lavar un tejido. El procedimiento comprende las etapas de poner en contacto un tejido que se va a lavar con dicha solución limpiadora

para lavado de ropa que comprende al menos una forma de realización de la composición limpiadora, el aditivo limpiador o una mezcla de los mismos de los solicitantes. El tejido puede comprender casi cualquier tejido que pueda lavarse en condiciones normales de uso institucional o privado. La solución tiene preferentemente un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 10,5. Las composiciones se pueden emplear en concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15.000 ppm en solución. Las temperaturas del agua normalmente varían de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 90 °C. La proporción de agua con respecto a tejido es normalmente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

A continuación se ejemplifican composiciones detergentes.

Tabla 1: Ejemplos de composiciones detergentes para ropa granulares diseñadas para lavado a mano o lavadoras de carga superior. Cada composición detergente para ropa granular está numerada del 1 al 6 para diferenciar las diferentes composiciones.

	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
Cloruro de dimetilhidroxietilamonio C ₁₂₋₁₄	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 de 1,6:1)	7	5	2	3	3	5
Carbonato de sodio	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 activos/g)	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1
Lipasa - Lipex® (18 mg activos/g)	0,03	0,07	0,3	0,1	0,07	0,4
*Amilasa de la presente invención (mg activos)	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
Percarbonato de sodio monohidratado	4,4	0,0	3,85	2,09	0,78	3,63
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 zinc sulfonada	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
Violeta directo 9	0,0	0,0	0,0003	0,0005	0,0003	0,0
Azul ácido 29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0003
Sulfato/Humedad	Balance					
*La amilasa de la presente invención se muestra como miligramos de enzima activa por 100 g de detergente.						

Tabla 2: Otros ejemplos (numerados del 7 al 12 a continuación en la tabla 2) de composiciones detergentes granulares para ropa diseñadas para lavadoras automáticas de carga frontal.

	7 (% en peso)	8 (% en peso)	9 (% en peso)	10 (% en peso)	11 (% en peso)	12 (% en peso)
Alquilbencenosulfonato lineal	8	7,1	7	6,5	7,5	7,5
AE3S	0	4,8	0	5,2	4	4
Alquilsulfato C12-14	1	0	1	0	0	0
AE7	2,2	0	3,2	0	0	0
Cloruro de dimetilhidroxietilamonio C ₁₀₋₁₂	0,75	0,94	0,98	0,98	0	0
Silicato cristalino estratificado (δ -Na ₂ Si ₂ O ₅)	4,1	0	4,8	0	0	0
Zeolita A	5	0	5	0	2	2
Ácido cítrico	3	5	3	4	2,5	3
Carbonato de sodio	15	20	14	20	23	23
Silicato 2R (SiO ₂ :Na ₂ O en una relación de 2:1)	0,08	0	0,11	0	0	0
Agente de desprendimiento de suciedad	0,75	0,72	0,71	0,72	0	0
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico	1,1	3,7	1,0	3,7	2,6	3,8
Carboximetilcelulosa	0,15	1,4	0,2	1,4	1	0,5
Proteasa- Purafect® (84 mg activos/g)	0,2	0,2	0,3	0,15	0,12	0,13
Lipasa - Lipex® (18,00 mg activos/g)	0,05	0,15	0,1	0	0	0
Celulasa - Celluclean™ (15,6 mg activos/g)	0	0	0	0	0,1	0,1
*Amilasa de la presente invención (mg activos)	4,0	2,0	1,0	0,7	6,0	3,0
Amilasa ⁴	0,15	0,04	0,03	-	0,01	0,16
TAED	3,6	4,0	3,6	4,0	2,2	1,4
Percarbonato	13	13,2	13	13,2	16	14
Sal de Na del ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) (EDDS)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Difosfonato de hidroxietano (HEDP)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
MgSO ₄	0,42	0,42	0,42	0,42	0,4	0,4
Perfume	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6
Aglomerado supresor de espuma	0,05	0,1	0,05	0,1	0,06	0,05
Jabón	0,45	0,45	0,45	0,45	0	0
Ftalocianina de zinc sulfonada (activa)	0,0007	0,0012	0,0007	0	0	0
S-ACMC	0,01	0,01	0	0,01	0	0
Violeta directo 9 (activo)	0	0	0,0001	0,0001	0	0
Sulfato/agua y varios	Balance					

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

Tabla 3: Ejemplos de composiciones detergentes para ropa líquidas de alta resistencia (numeradas del 13 al 18)

	13 (% en peso)	14 (% en peso)	15 (% en peso)	16 (% en peso)	17 (% en peso)	18 (% en peso)
Alquiletoxi(1,8)sulfato C ₁₂₋₁₅	14,7	11,6		16,31		17,29
Alquilbencenosulfonato C ₁₁₋₈	4,3	11,6	8,3	7,73	11,7	7,73
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	1,7	1,29		3,09		3,3
Alquil-9-etoxilato C ₁₂₋₁₄	0,9	1,07		1,31		1,31
Óxido de dimetilamina C ₁₂	0,6	0,64		1,03		1,03
Ácido cítrico	3,5	0,65	3	0,66	2,27	0,67
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	1,5	2,32	3,6	1,52	0,82	1,52
Borato de sodio (bórax)	2,5	2,46	1,2	2,53		2,53
Alquil-etoxi-3-sulfato C ₁₂₋₁₄ de sodio			2,9		3,9	
Alquil-7-etoxilato C ₁₄₋₁₅			4,2		1,9	
Alquil-7-etoxilato C ₁₂₋₁₄			1,7		0,5	
Cloruro de Ca dihidratado					0,045	
Formiato de Ca	0,09	0,09		0,09		0,09
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 aleatorio ¹		1,46	0,5		0,83	
Polietilenimina etoxilada ²	1,5	1,29		1,44		1,44
Ácido dietilentriaminopentaacético	0,34	0,64		0,34		0,34
Dietilentriamina-penta(ácido metilfosfónico)			0,3		0,3	
Ácido 1-hidroxietiden-1,1-difosfónico					0,18	
Sal disódica del ácido dihidroxibenceno-3,5-disulfónico hidratada						0,19
Tinopal AMS-GX		0,06				0,29
Tinopal CBS-X	0,2	0,17		0,29		
Tinopal TAS-X B36					0,091	
Polímero limpiador de grasas alcoxilado anfífilo 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
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
*Amilasa de la presente invención (mg activos)	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
Cumenosulfonato de sodio			1		0,95	
Formiato de sodio		0,11		0,09	0,2	0,12

	13 (% en peso)	14 (% en peso)	15 (% en peso)	16 (% en peso)	17 (% en peso)	18 (% en peso)
Agua, productos estéticos (tintes, perfumes) y productos secundarios (enzimas que incluyen lipasa, proteasa, amilasa adicional, cada una al 0,2% de proteína activa, disolventes, estructurantes)	Balance					
¹ El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con poli(acetato de vinilo) que tiene una estructura principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de poli(acetato de vinilo). El peso molecular de la cadena principal de óxido de polietileno es aproximadamente 6000 y la relación en peso de poli(óxido de etileno) a poli(acetato de vinilo) es aproximadamente de 40 a 60 y no más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno. ² Polietilenimina (MW = 600) con 20 grupos etoxilato por -NH. ³ El polímero limpiador de grasa alcoxilado anfifílico es una polietilenimina (MW = 600) con 24 grupos etoxilato por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH. *La amilasa de la presente invención se muestra como miligramos de enzima activa por 100 g de detergente.						

Tabla 4: Ejemplos de composición detergente para ropa líquida de alto rendimiento (numerados del 19 al 21)

	19 (% en peso)	20 (% en peso)	21 (% en peso)
Alquilbencenosulfonato de sodio	21,0	10,2	3,53
Alquil-1.5-9-etoxilato C ₁₂₋₁₈	18,0	6,32	0,88
Alquilsulfato ramificado			2,44
Alquil-etoxi-1-3-sulfato de sodio		1,17	14,81
Ácido cítrico		3,14	2,05
Óxido de dimetilamina C ₁₂			0,56
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	15,0	2,59	1,48
Proteasa (Purefect Prime [®] , 40,6 mg activos/g)	1,5	0,52	1,64
Mananasa (Mannaway [®] , 11mg activos/g)	0,1	0,06	
Xiloglucanasa (Whitezyme [®] , 20 mg activos/g)	0,2	0,06	
Lipasa (ILipex)	0,1	0,2	0,05
*Amilasa de la presente invención (mg activos)	5,9	2,3	12,8
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	2,0	0,63	
Copolímero de injerto aleatorio ¹		1,07	
Polietilenimina etoxilada ²	0,8		1,51
Polímero alcoxilado anfifílico ³			
Amilasa ⁴			
Quelante fosfonado	0,8	0,41	0,53
Hidrótopo		0,93	
Abrillantador	0,2	0,09	0,19
Tinte tonalizador de tiofeno etoxilado	0,004		
Productos secundarios: colorantes, perfumes, microcápsulas de perfumes, enzimas, estabilizadores de enzimas, disolventes, estructurantes, agentes modificadores del pH	Balance	Balance	Balance

	19 (% en peso)	20 (% en peso)	21 (% en peso)
*La amilasa de la presente invención se muestra como miligramos de enzima activa por 100 g de detergente.			
**Con respecto al peso total de la composición de limpieza y/o tratamiento, un total de no más del 7% de agua. <u>Materias primas y notas para los ejemplos de composiciones 1-21</u>			
Alquilbencenosulfonato lineal que tiene una longitud de cadena de carbono alifática promedio C ₁₁ -C ₁₈			
Cloruro de dimetilhidroxietilamonio C ₁₂₋₁₈			
AE3S es alquil-etoxi(3)sulfato C ₁₂₋₁₅			
AE7 es etoxilato de alcohol C ₁₂₋₁₅ , con un grado medio de etoxilación de 7			
AE9 es etoxilato de alcohol C ₁₂₋₁₈ , con un grado medio de etoxilación de 9			
HSAS es un alquilsulfato primario de ramificación media con una longitud de cadena de carbono de aproximadamente 16-17 tal como se divulga en los documentos US 6.020.303 y US 6.060.443			
El poliacrilato MW 4500 se suministra por BASF			
La carboximetilcelulosa es Finnfix® V suministrada por CP Kelco, Arnhem, Países Bajos			
CHEC es un polímero de hidroxietilcelulosa modificado catiónicamente.			
Los quelantes de fosfonato son, por ejemplo, ácido dietilentetraaminopentaacético (DTPA) y difosfonato de hidroxietano (HEDP).			
Savinase®, Natalase®, Stainzyme®, Lipex®, Celluclean™, Mannaway® y Whitezyme® son todos productos de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.			
Purafect®, Purafect Prime® son productos de Genencor International, Palo Alto, California, Estados Unidos Abrillantador fluorescente 1 es Tinopal® AMS, Abrillantador fluorescente 2 es Tinopal® CBS-X, Violeta directo 9 es Pergasol® Violet BN-Z NOBS es nonanoiloxibencenosulfonato de sodio			
TAED es tetraacetiletilendiamina			
S-ACMC es carboximetilcelulosa conjugada con C.I. Azul reactivo 19 nombre del producto AZO-CM-CELLULOSE			
El agente de desprendimiento de suciedad es Repel-o-tex® FP			
El copolímero de ácido acrílico/ácido maleico tiene un peso molecular de 70.000 y una relación de acrilato:maleato de 70:30. EDDS es una sal sódica del ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico, isómero (S,S). El aglomerado supresor de espuma se suministra por Dow Corning, Midland, Michigan, Estados Unidos			
HSAS es alquilsulfato de ramificación media			
Violeta CT Liquitint® se suministra por Milliken, Spartanburg, Carolina del Sur, Estados Unidos			
¹ El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con poli(acetato de vinilo) que tiene una estructura principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de poli(acetato de vinilo). El peso molecular de la cadena principal de poli(óxido de etileno) es aproximadamente 6000 y la relación en peso de poli(óxido de etileno) a poli(acetato de vinilo) es aproximadamente de 40 a 60 y no más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.			
² Polietilenimina (MW = 600) con 20 grupos etoxilato por -NH.			
³ El polímero alcoxlado anfílico es una polietilenimina (MW 600), preparada a partir de un polímero que se derivatiza para que contenga 24 grupos etoxilato por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH. Amilasa ⁴ es cualquiera de a) a k) en el presente documento (mg de proteína activa).			

Tabla 5: Ejemplos de composiciones detergentes para ropa de dosis unitaria (numeradas del 22 al 26) Dichas formulaciones de dosis unitaria pueden comprender uno o múltiples compartimentos.

	22 (% en peso)	23 (% en peso)	24 (% en peso)	25 (% en peso)	26 (% en peso)
Ácido alquilbencenosulfónico	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
Alquil-etoxi-3-sulfato C ₁₂₋₁₈ de sodio	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Alquil-7-etoxilato C ₁₂₋₁₈	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 activos)	6	12	8	2	10
Polietilenimina etoxilada ¹	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Proteasa (Purefect Prime®, 40,6 mg activos/g)	1,4	2,0	0,9	1,2	0
Celulasa (Celluclean, proteína activa)	0,1	0,2			0,1
Amilasa ⁴ (proteína activa) a) a k) en el presente documento	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)	A pH 8,0				
Disolventes (1,2-propanodiol, etanol)	Hasta el 100%				
*La amilasa de la presente invención se muestra como miligramos de enzima activa por 100 g de detergente.					
¹ Polietilenimina (MW = 600) con 20 grupos etoxilato por -NH.					

5 Tabla 6: Ejemplo de composición de dosis unitaria de múltiples compartimentos (numerada como 27). A continuación se proporcionan formulaciones de detergente para ropa en dosis unitarias de múltiples compartimentos de la presente invención. En estos ejemplos la dosis unitaria tiene tres compartimentos, pero se pueden preparar composiciones similares con dos, cuatro o cinco compartimentos. La película utilizada para encapsular los compartimentos es poli(alcohol vinílico).

Composición base 1	27 (% en peso)
Glicerol (min 99)	5,3
1,2-propanodiol	10,0
Ácido cítrico	0,5
Monoetanolamina	10,0
Soda cáustica	-
Dequest 2010	1,1
Sulfito de potasio	0,2

Composición base 1	27 (% en peso)
*Amilasa de la presente invención (mg activos)	8,0
Marlipal C24EO7 no iónico	20,1
HLAS	24,6
Abrillantador óptico FWA49	0,2
Ácido graso C12-15	16,4
Polímero Lutensit Z96	2,9
Etoxilato de polietilenimina PEI600 E20	1,1
MgCl ₂	0,2
Disolventes (1,2-propanodiol, etanol)	Hasta el 100%

Tabla 7: Formulaciones de múltiples compartimentos (numeradas como composición 1 o 2 y con una designación de compartimento [A, B o C]).

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
TiO ₂	0,1	-	-	-	0,1	-
Sulfito de sodio	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
Acusol 305	1,2			2	-	-
Aceite de castor hidrogenado	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
Composición base 1	Añadir hasta el 100%	Añadir hasta el 100%	Añadir hasta el 100%	Añadir hasta el 100%	Añadir hasta el 100%	Añadir hasta el 100%

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

- 5 Las dimensiones y valores divulgados en el presente documento no deben entenderse como estrictamente limitados a los valores numéricos exactos citados. En cambio, a menos que se especifique lo contrario, se pretende que cada una de estas dimensiones signifique tanto el valor citado como un intervalo funcionalmente equivalente que rodea ese valor. Por ejemplo, una dimensión descrita como "40 mm" se pretende que signifique "aproximadamente 40 mm".

10 EJEMPLOS

Ensayo pNP-G7 para la determinación de la actividad de alfa-amilasa

- 15 La actividad de alfa-amilasa puede determinarse mediante un procedimiento que emplea el sustrato G7-pNP. G7-pNP es una abreviatura de 4,6-etiliden(G7)-*p*-nitrofenil(G1)- α ,D-maltoheptaósido, un oligosacárido bloqueado que puede escindirse mediante una endoamilasa, tal como una alfa-amilasa. Después de la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el kit digiere el sustrato hidrolizado para liberar posteriormente una molécula de PNP libre que tiene un color amarillo y, por tanto, puede medirse mediante espectrofotometría visible a $\lambda = 405 \text{ nm}$ (400-420 nm). Los kits que contienen sustrato G7-pNP y alfa-glucosidasa se fabrican por Roche/Hitachi (Nº de cat. 11876473).

20 **REACTIVOS:**

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

25

El reactivo alfa-glucosidasa contiene HEPES 52,4 mM, NaCl 87 mM y $MgCl_2$ 12,6 mM, $CaCl_2$ 0,075 mM, ≥ 4 kU/l de alfa-glucosidasa).

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

Tampón de dilución: MOPS 50 mM, 0,05% (p/v) Triton X100 (polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ ($n = 9-10$))), $CaCl_2$ 1 mM, pH 8,0.

10 **PROCEDIMIENTO:**

La muestra de amilasa que se va a analizar se diluyó en tampón de dilución para garantizar que el pH en la muestra diluida fuera 7. El ensayo se realizó transfiriendo 20 μ l de muestras de enzima diluidas a una placa de microvaloración de 96 pocillos y añadiendo 80 μ l de solución de trabajo de sustrato. La solución se mezcló y se preincubó durante 15 1 minuto a temperatura ambiente y se midió la absorción cada 20 segundos a lo largo de 5 minutos a una DO de 405 nm.

La pendiente (absorbancia por minuto) de 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 debe diluirse hasta un nivel en el que la pendiente se encuentre por debajo de 0,4 unidades de absorbancia por minuto.

Ensayo de estrés mecánico automático (AMSA) para lavado de ropa

25 Para evaluar el rendimiento de lavado en lavado de ropa, se realizan experimentos utilizando el ensayo de estrés mecánico automático (AMSA). Con el AMSA, se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones de detergente enzimático de pequeño volumen. La placa AMSA tiene varias ranuras para soluciones de ensayo y una tapa que aprieta firmemente la muestra de ropa y el material textil que se va a lavar contra todas las aberturas de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de ensayo, el material textil y la tapa se agitan vigorosamente para poner la solución de ensayo en contacto con el material textil y aplicar estrés mecánico de forma oscilante periódica y regular. Para una descripción más profunda véase el documento WO02/42740 especialmente el párrafo "Special method embodiments" en la página 23-24.

Descripción general del rendimiento de lavado

35 Se prepara una solución de ensayo que comprende agua (10°dH), detergente, por ejemplo 5,1 g/l de detergente líquido europeo tal como se describe a continuación y la enzima de la invención, por ejemplo a una concentración de 0, 0,8 y/o 1,2 mg de proteína enzimática/l. Se añaden tejidos manchados con almidón (por ejemplo 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 de enjuagar a fondo con agua corriente del grifo y secar en la oscuridad, se miden posteriormente los valores de intensidad de la luz o de reflectancia de los tejidos manchados como medida del rendimiento de lavado. El ensayo con 40 0 mg de proteína enzimática/l se utiliza como blanco para obtener un valor de remisión delta. Preferentemente se aplica acción mecánica durante la etapa de lavado, por ejemplo en forma de agitación, rotación o agitación de la solución de lavado con los tejidos.

45 Los experimentos de rendimiento de lavado AMSA se realizaron en las condiciones experimentales que se especifican a continuación

Tabla 8: Condiciones experimentales de AMSA

Dosis de detergente líquido para ropa	5,7 g/l de detergente líquido europeo (UE) (véase el ejemplo 1A), o 0,8 g/l de detergente líquido de América del Norte (Estados Unidos) (véase el ejemplo 1B)
Volumen de solución de ensayo	160 microlitros
pH	como tal
Tiempo de lavado	5-20 minutos, preferentemente 20 minutos
Temperatura	15-40 °C, preferentemente 20 °C
Dureza del agua	10°dH, $Ca^{2+}:Mg^{2+}:HCO_3^- = 3:1:6$
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 Triton X-100 al 0,01% para reducir el riesgo de adsorción de proteína enzimática a 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. Después del lavado, los materiales textiles se lavaron con agua del grifo y se secaron.

El rendimiento de lavado se mide como el brillo del color del material textil lavado. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada por la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra está manchada, la intensidad de la luz reflejada es inferior a la de una muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada se puede utilizar para medir el rendimiento de lavado.

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

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

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

Los resultados del ensayo de lavado de ropa AMSA de diferentes variantes se muestran en las tablas 1 y 2. En el resultado, el índice es 100. Al resultado de rendimiento de la alfa-amilasa progenitora se le asigna el valor de 100 y los resultados de las variantes se comparan con este valor.

Rendimiento de lavado TOM

La dureza del agua se ajustó a la concentración que se describe 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 balde tal como se describe a continuación. El detergente se disolvió durante una agitación magnética de 10 minutos (la solución de lavado se usó entre 30 y 60 minutos después de la preparación).

La temperatura y la rotación (rpm) en el baño de agua en el Terg-O-toMeter se configuraron de acuerdo con los ajustes que se indican a continuación en la tabla 2. Cuando se ajustó la temperatura de acuerdo con los ajustes (la tolerancia es $\pm 0,5$ °C), se añadió solución de lavado a un recipiente TOM según la cantidad que se describe a continuación.

La agitación en el recipiente fue a 200 rpm. Se añadieron 2 muestras de almidón de arroz hecho a mano (HM CS-28), 2 muestras de almidón de tapioca hecho a mano (HM CS-29) y lastre a cada uno de los recipientes y se realizó el lavado según el tiempo indicado a continuación. Las muestras se enjuagaron con agua del grifo fría durante 5 minutos, 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 una cabina de secado sin calor durante la noche.

Las muestras de materiales textiles HM CS-28 (almidón de arroz sobre algodón, 5x5 cm, almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro) y HM CS-29 (almidón de tapioca sobre algodón, 5x5 cm, almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro) se obtuvieron del Center for Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos.

Se utilizó algodón tejido blanco como lastre y se obtuvo de Warwick Equest Ltd, Unit 55, Consett Business Park, Consett, County Durham, DH8 6BN Reino Unido.

Tabla 9: Condiciones experimentales

	Condiciones europeas utilizando WE SUD	Condiciones europeas utilizando WE HDL
Dosis 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 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{HCO}_3^- = 4:1:7,5$)	
Volumen de solución de ensayo	1000 ml	

	Condiciones europeas utilizando WE SUD	Condiciones europeas utilizando WE HDL
Tiempo de lavado	5-15 minutos, preferentemente 15 minutos	
Rotación	200 rpm	
pH	como tal	
Temperatura	15-40 °C, preferentemente a 15 °C	

Los detergentes y los materiales de ensayo fueron los siguientes:

Detergente líquido para ropa	Condiciones europeas (WE) WE SUD tal como se describen en el ejemplo 2A a continuación y WE HDL tal como se describen en el ejemplo 2B a continuación (detergente K).
Material de ensayo	HM CS-28 (almidón de arroz sobre algodón, muestra de 5x5 cm con almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro), HM CS-29 (almidón de tapioca sobre algodón, muestra de 5x5 cm con almidón aplicado en un círculo de 2,5 cm de diámetro).
Lastre	Algodón tejido blanco de tamaño 5x5 cm añadido hasta un peso total de 40 g (40 g incluyendo todas las muestras, es decir, lastre y material de ensayo).

- 5 El rendimiento de lavado se midió como el brillo del color del tejido lavado expresado en valores de remisión (REM). Las mediciones de remisión se realizaron utilizando un espectrofotómetro Macbeth 7000 Color Eye. Se midió cada una de las muestras secas. Como existe el riesgo de interferencias del fondo, las muestras se colocaron encima de 2 capas de tejido durante la medición de la remisión. La remisión se midió a 460 nm. El filtro UV no estaba incluido. Se calculó un resultado promedio de remisión para las muestras.
- 10 El rendimiento de lavado de diferentes variantes se muestra en la tabla 5 como Factor de mejora (IF) y se calcula tal como se muestra a continuación

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

15 Ejemplo 1

Rendimiento de lavado de alfa-amilasas mediante ensayo de estrés mecánico automático

- 20 Para evaluar el rendimiento de lavado de las alfa-amilasas en una composición de base detergente, se pueden realizar experimentos de lavado usando un ensayo de estrés mecánico automático (AMSA). Con el ensayo AMSA, se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones de detergente enzimático de pequeño volumen. La placa AMSA tiene varias ranuras para soluciones de ensayo y una tapa que aprieta firmemente la muestra de material textil que se va a lavar contra todas las aberturas de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de ensayo, el material textil y la tapa se agitan vigorosamente para poner la solución de ensayo en contacto
- 25 con el material textil y aplicar estrés mecánico de forma oscilante periódica y regular. Para una descripción más profunda véase el documento WO02/42740 especialmente el párrafo "Special method embodiments" en la página 23-24.

30 Descripción general del rendimiento de lavado

- Se prepara una solución de ensayo que comprende agua (6°dH o 15°dH), 0,79 g/l de detergente, por ejemplo el detergente modelo J tal como se describe a continuación, y la enzima de la invención a una concentración de 0 o 0,2 mg de proteína enzimática/l. Se añaden tejidos manchados con almidón (CS-28 del Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT, Vlaardingen, Países Bajos) y se lavan durante 10 minutos a 20 °C y 40 °C, o alternativamente 10 minutos a 20 °C y 30 °C tal como se especifica en los ejemplos. Después de enjuagar a fondo con agua del grifo y de secar en la oscuridad, se miden posteriormente los valores de intensidad de la luz de los tejidos manchados como medida del rendimiento de lavado. El ensayo con 0 mg de proteína enzimática/l se utiliza como blanco y corresponde al aporte del detergente. Preferentemente se aplica acción mecánica durante la etapa de lavado, por ejemplo en forma de sacudidas, rotación o agitación de la solución de lavado con los tejidos. Los experimentos de rendimiento de lavado AMSA pueden realizarse en las condiciones experimentales que se especifican a continuación
- 40

Tabla A: Condiciones experimentales

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

Tabla B: Detergente modelo J

Compuesto	Contenido de compuesto (% p/p)	% de 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 de sodio	4,00	4,00
Formiato de sodio	1,00	1,00
Hidróxido de sodio	0,66	0,66
H ₂ O, con intercambio de iones	58,95	58,95

- 5 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. Después del lavado, los materiales textiles se lavaron con agua del grifo y se secaron.

Tabla C: Condiciones experimentales

Detergente	Detergente líquido modelo A (véase la tabla D)
Dosis de detergente	3,33 g/l
Volumen de solución de ensayo	160 microlitros
pH	como tal
Tiempo de lavado	10 minutos
Temperatura	20 °C o 40 °C
Dureza del agua	15°dH
Concentración de enzima en el ensayo	0,2 mg de proteína enzimática/l y 0,05 mg de proteína enzimática/l
Material de ensayo	CS-28 (algodón con almidón de arroz)

Tabla D: Detergente modelo A

Compuesto	Contenido de compuesto (% p/p)	% de 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 de sodio	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 de sodio	1,00	1,00
Citrato de sodio	2,00	2,00
DTMPA	0,48	0,20
PCA	0,46	0,18
Fenoxietanol	0,50	0,50
H ₂ O, con 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. Después del lavado, los materiales textiles se lavaron con agua del grifo y se secaron.

5

Tabla E: Condiciones experimentales

Detergente	[Detergente Composición K]
Dosis de detergente	5,3 g/l
Volumen de solución de ensayo	160 microlitros
pH	como tal
Tiempo de lavado	10 minutos
Temperatura	20 °C o 40 °C
Dureza del agua	15°dH
Concentración de enzima en el ensayo	0,2 mg de proteína enzimática/l y 0,05 mg de proteína enzimática/l
Material de ensayo	CS-28 (algodón con almidón de arroz)

Tabla F: Detergente K (tal como se especifica en la tabla 11 a continuación)

Compuesto	Contenido de compuesto (% en peso activo)
Alquilbencenosulfonato de sodio	8,7
Alquiletoxi-3-sulfato de sodio	1,0
Alquil-1.5-7-etoxilato C12-18	5,3
Ácido cítrico	3,1
Abrillantador óptico	0,05
Polipropilenglicol	1,1
Quelante fosfonado	0,5

Compuesto	Contenido de compuesto (% en peso activo)
Productos secundarios (colorantes, perfumes, enzimas, estabilizadores enzimáticos, disolventes, estructurantes, polímeros) y agua.	hasta el 100%

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. Después del lavado, los materiales textiles se lavaron con agua del grifo y se secaron.

- 5 El rendimiento de lavado 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 está manchada, la intensidad de la luz reflejada es inferior a la de una muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada se puede utilizar para medir el rendimiento de lavado.

- 10 Las mediciones de color se realizan con un escáner de superficie plana profesional (EPSON Expression 10000XL, EPSON) utilizado para capturar una imagen del material textil lavado.

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

15

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

- 20 El rendimiento de lavado de las variantes según la invención se muestra en las tablas siguientes. La tabla 3 muestra los resultados obtenidos del experimento accediendo al rendimiento de lavado 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 accediendo al rendimiento de lavado en 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 10: Resultados de rendimientos de lavado en detergentes de modelo

Mutaciones	0,05 mg/l-A-20C								0,2 mg/l-A-20C								0,05 mg/l-A-40C								0,2 mg/l-A-40C								0,05 mg/l-J-20C								0,2 mg/l-J-20C								0,05 mg/l-J-30C								0,2 mg/l-J-30C							
	4,7								1,5								2,3								1,1								2,7								1,1								3,5								1,5							
SEQ ID NO: 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							
SEQ ID NO: 2 + G7A+W284H+ K320A+M323N	4,7								1,4								1,8								1,0								3,0								1,1								2,0								1,2							
SEQ ID NO: 2 + G7A+K320A+ M323N	4,3								1,6								2,0								1,0								2,0								1,1								2,0								1,2							
SEQ ID NO: 2 + K320A	4,7								1,3								2,3								1,0								3,7								1,0								4,5								1,6							
SEQ ID NO: 2 + G7A+K320A	4,3								1,4								2,3								1,1								3,3								1,1								2,5								1,3							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,7								1,2								1,3								1,3								1,5								1,3								1,1								1,4							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+N280S+W284H+E391A	2,3								1,7								2,8								1,4								5,0								2,0								5,5								1,8							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+N280S+E391A	0,8								1,0								1,0								1,1								1,0								1,1								1,3								1,1							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+N280S+M323S+E391A	1,3								1,9								1,5								1,3								1,5								1,5								1,6								1,6							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+E391A	1,5								1,2								1,3								1,2								1,2								1,1								1,7								1,1							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+M323S+E391A	1,3								1,3								1,5								1,1								1,0								1,0								1,2								1,1							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+M323N+E391A	1,4								1,3								1,3								1,2								1,0								1,2								1,6								1,1							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+W284F+E391A	1,3								1,4								1,3								1,2								0,9								1,2								1,6								1,0							
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+W284R+E391A	1,1								1,3								1,0								1,0								0,7								1,2								1,4								0,9							

SEQ ID NO: 2 +	1,1	1,3	0,9	1,1	0,5	1,2	0,8	1,0
H1*+G7A+G109A+N280S+ K320A+M323S+ E391A								
SEQ ID NO: 2 +	1,0	1,2	0,9	1,1	0,6	1,1	1,1	1,0
H1*+G7A+G109A+W284R+E391A								
SEQ ID NO: 2 +	1,0	1,2	0,8	1,0	0,8	1,2	0,9	1,0
H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A								

Mutaciones	0,05 mg/l-A-20C	0,2 mg/l-A-20C	0,05 mg/l-A-40C	0,2 mg/l-A-40C	0,05 mg/l-J-20C	0,2 mg/l-J-20C	0,05 mg/l-J-30C	0,2 mg/l-J-30C
SEQ ID NO: 2+	4,7	1,5	2,3	1,1	2,7	1,1	3,5	1,5
H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+K320A+M323N+E391A								
SEQ ID NO: 2+G7A+W284H+K320A+M323N	4,7	1,4	1,8	1,0	3,0	1,1	2,0	1,2
SEQ ID NO: 2+ G7A+K32DA+M 323N	4,3	1,6	2,0	1,0	2,0	1,1	2,0	1,2
SEQ ID NO: 2+ K320A	4,7	1,3	2,3	1,0	3,7	1,0	4,5	1,5
SEQ ID NO: 2+ G7A+K32DA	4,3	1,4	2,3	1,1	3,3	1,1	15	1,3
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,7	1,2	1,3	1,3	1,5	1,3	1,1	1,4
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+W284H+E391A	2,3	1,7	2,8	1,4	5,0	2,0	5,5	1,8
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+E391A	0,8	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1	1,3	1,1

SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+M323S+E391A	1,3	1,9	1,5	1,3	1,5	1,5	1,6	1,6
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+E391A	1,5	1,2	1,3	1,2	1,2	1,1	1,7	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+M323S+E391A	1,3	1,3	1,5	1,1	1,0	1,0	1,2	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+M323N+E391A	1,4	1,3	1,3	1,2	1,0	1,2	1,6	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+W284F+E391A	1,3	1,4	1,3	1,2	0,9	1,2	1,6	1,0
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+W284R+E391A	1,1	1,3	1,0	1,0	0,7	1,2	1,4	0,9
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A	1,1	1,3	0,9	1,1	0,5	1,2	0,8	1,0
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+W284R+E391A	1,0	1,2	0,9	1,1	0,6	1,1	1,1	1,0
SEQ ID NO: 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 11: Resultados de rendimientos de lavado en detergente K

Mutaciones	0,05 mg/l-Arlel-20C	0,2 mg/l-Arlel-20C	0,05 mg/l-Arlel-40C	0,2 mg/l-Arlel-40C
	Referencia - SEQ ID NO: 2	1,0	1,0	1,0
	SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+E391A	1,1	1,0	2,0
	SEQ ID NO: 2+ H1*+G7K+G109A+N280S+E391A	1,2	1,6	0,9
	SEQ ID NO: 2+ H1*+G7E+G109A+N280S+E391A	1,2	1,6	0,6
	SEQ ID NO: 2+ H1*+G7N+G109A+N280S+E391A	0,9	1,6	1,0

SEQ ID NO: 2+ H1*+G7Q+G109A+N280S+E391A	1,6	1,6	1,1	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7L+G109A+N280S+E391A	1,6	1,6	1,4	1,3
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7D+G109A+N280S+E391A	1,9	1,6	1,5	1,3
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+K320A+E391A	0,4	0,9	1,0	1,3
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+K320M+E391A	1,5	1,1	1,8	1,3
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+K320T+E391A	1,3	1,1	1,5	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+K320V+E391A	1,0	0,9	1,7	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+M323R+E391A	0,7	0,9	1,3	1,0
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+K320S+E391A	1,8	1,3	1,8	1,3
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+E391V	1,3	1,1	2,0	1,3
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+W284R+E391A	1,2	1,3	1,2	1,2
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+W284F+E391A	1,7	1,3	1,8	1,2
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+K320A+M323S+E391A	2,0	1,4	1,4	1,2
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+W284F+E391A	0,9	0,9	1,3	1,0
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+M323N+E391A	2,0	1,6	2,0	1,3
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+M323K+E391A	2,3	1,6	2,0	1,6
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109S+N280S+E391A	2,5	1,3	2,3	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+W284H+E391A	1,5	1,2	1,3	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,6	1,1	1,2	1,1
SEQ ID NO: 2+ H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,5	1,4	1,2	1,2

Como puede observarse en la tabla 10 y la tabla 11, todas las variantes sometidas a ensayo tienen un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la referencia (SEQ ID NO: 2) en al menos una de las condiciones de ensayo.

5 Ejemplo 2 - Rendimiento de lavado en TOM de alfa-amilasas en detergente líquido K

El rendimiento de lavado de la variante sometida a ensayo y la alfa-amilasa progenitora correspondiente (SEQ ID NO: 2) se evaluaron tal como se ha descrito anteriormente para el lavado a escala TOM. El detergente utilizado fue el detergente K. Los resultados se indican como (rendimiento de la variante menos rendimiento del blanco) dividido por (rendimiento del progenitor menos rendimiento del blanco).

Tabla 12: Rendimiento de lavado en escala TOM

	Detergente K [WE HDL]	
	IF HM CS-28	IF HM CS-29
Referencia /SEQ ID NO: 2)	1,00	1,00
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+W284H+E391A	1,28	1,58
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,13	1,61
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,22	2,02

Tabla 13: Rendimiento de lavado en escala TOM

1 litro, lavado de 5 minutos 0,13 mg de proteína enzimática/l	Det. K	
	IF HM CS-29	IF HM CS-26
Referencia SEQ ID NO: 2	1,00	1,00
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+W284H+E391A	1,00	1,00
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,08	1,11
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,10	1,13

Tabla 14: Rendimiento de lavado en ensayo de lavadora a escala completa

Escala completa, 0,072 mg de proteína enzimática/l	Det. K	
	IF HM CS-29	IF HM CS-26
Referencia SEQ ID NO: 2	1,00	1,00
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+W284H+E391A	1,07	1,02
SEQ ID NO: 2 + H1*+G109A+N280S+K320A+M323N+E391A	1,22	1,32
SEQ ID NO: 2 + H1*+G7A+G109A+N280S+E391A	1,32	1,41

REIVINDICACIONES

1. Una variante de una alfa-amilasa progenitora, en la que dicha variante comprende
 - (i) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones G109A y G7A de la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2,
 - (ii) dicha variante tiene al menos el 90%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2, y
 - (iii) dicha variante tiene actividad de alfa-amilasa,
- en la que dicha variante tiene un rendimiento de lavado mejorado a una temperatura baja de entre 10-35 °C en comparación con la secuencia de aminoácidos progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2.
2. La variante según la reivindicación 1, en la que dicha variante tiene al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa progenitora expuesta en la SEQ ID NO: 2.
3. La variante según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha variante comprende modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, seleccionadas del grupo que consiste en:
H1*+G7A+G109A+N280S+E391A;
H1*+G7A+G109A+N280S+W284H+K320A+M323N+E391A;
H1*+G7A+G109A+N280S+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;
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.
4. La variante según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha alfa-amilasa progenitora es la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, o cualquier alfa-amilasa que tenga al menos el 90%, tal como al menos el 92%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 97%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 2.
5. La variante según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha alfa-amilasa progenitora comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1 y 2.
6. Un polinucleótido que codifica dicha variante según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Un constructo de ácido nucleico que comprende dicho polinucleótido según la reivindicación 6.
8. Un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido según la reivindicación 6.
9. Una célula huésped que comprende dicho polinucleótido según la reivindicación 6.
10. Un procedimiento para producir una variante de alfa-amilasa, que comprende:
 - a. cultivar dicha célula huésped según la reivindicación 9 en condiciones adecuadas para la expresión de dicha variante; y
 - b. recuperar dicha variante.