

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 608**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2012 E 12155909 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2628785**

54 Título: **Composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.09.2016

73 Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)
Henkelstrasse 67
40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

BESENMATTER, WERNER;
BENIE, ASTRID y
MALTEN, MARCO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 582 608 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilisina

5 Referencia a un listado de secuencias

Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma legible por ordenador, que se incorpora por referencia en el presente documento.

10 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15 La presente invención se relaciona con composiciones detergentes que contienen proteasa, especialmente composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilisina que presentan alteraciones en relación con la subtilisina precursora en una o más propiedades que incluyen: rendimiento de lavado, estabilidad térmica, estabilidad de almacenamiento o actividad catalítica. Además, la presente invención se relaciona con métodos de producir dichas composiciones detergentes y con el uso de dichas composiciones detergentes en aplicaciones de limpieza.

20 Descripción de la técnica relacionada

En la industria de los detergentes, las enzimas se han implementado en las formulaciones de lavado durante más de 25 30 años. Las enzimas usadas en dichas formulaciones comprenden proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, manosidasas, así como otras enzimas o mezclas de las mismas. Comercialmente, las enzimas más importantes son las proteasas.

30 Un número creciente de proteasas usadas comercialmente son variantes de proteasas de tipo silvestre de origen natural modificadas por ingeniería de proteínas, p. ej., Everlase[®], Relase[®], Ovozyme[®], Polarzyme[®], Liqunase[®], Liqunase Ultra[®] y Kannase[®] (Novozymes a/s), Purafast[®], Purafect OXP[®], FN3[®], FN4[®] y Excellase[®] (Genencor International, Inc.) y BLAP (documento US5352604, figure 29) (Henkel AG & Co. KGaA).

35 Además, se han descrito en la técnica una serie de variantes, tales como en el documento WO 04/041979 (NOVOZYMES A/S) que describe variantes de subtilisina que presentan alteraciones en relación con la subtilisina precursora, p. ej., en el rendimiento de lavado, estabilidad térmica, estabilidad de almacenamiento o actividad catalítica. Las variantes son adecuadas para su uso, p. ej., en la limpieza o las composiciones detergentes.

40 Se han descrito una serie de variantes de subtilisina útiles, muchas de las cuales han proporcionado actividad, estabilidad, y solubilidad mejoradas en diferentes detergentes. El documento WO9402618 describe variantes de subtilisina con estabilidad de almacenamiento mejorada. Las sustituciones L211X y N212Z en las que X es cualquier aminoácido excepto L y Z es cualquier aminoácido excepto N se mencionan junto con algunas otras mutaciones. Sin embargo, no se muestra ningún rendimiento de lavado para estas variantes y no se menciona nada en relación con manchas específicas tales como las manchas de huevo. Se conoce bien en la técnica que las manchas de huevo son particularmente difíciles de eliminar completamente y, aunque se han descrito varias variantes de proteasas con 45 rendimiento mejorado sobre las manchas de huevo, p. ej., en el documento WO0144452, aún existe una necesidad de composiciones detergentes con proteasas que tengan alto rendimiento de lavado sobre diversas manchas incluyendo las manchas de huevo.

50 Es, por lo tanto, un objeto de la presente invención proporcionar composiciones detergentes con variantes de una proteasa con propiedades mejoradas en comparación con su proteasa precursora.

Sumario de la invención

55 La presente invención se relaciona con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D o E y en la que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o 4, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.

60 La presente invención también se relaciona con un método para producir una composición detergente que comprende la etapa de añadir una variante de subtilisina que se ha obtenido mediante un método que comprende introducir en una subtilisina precursora las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en el que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D o E, y en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o 4, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones. La invención 65 también se relaciona con composiciones detergentes obtenidas mediante dicho método.

La invención se relaciona además con el uso de composiciones detergentes de acuerdo con la invención en procesos de limpieza tales como lavandería y/o lavado de vajillas.

Definiciones

5 Proteasa: El término "proteasa" se define en el presente documento como una enzima que hidroliza los enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima perteneciente al grupo enzimático EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases del mismo). El número de EC se refiere a la Nomenclatura enzimática de 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluyendo los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1996, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente.

15 Actividad proteasa: La expresión "actividad proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4). Las proteasas de la invención son endopeptidasas (EC 3.4.21). Hay varios tipos de actividad proteasa: Los tres tipos de actividad principales son: de tipo tripsina, en los que hay escisión de sustratos amida después de Arg o Lys en P1, de tipo quimiotripsina, en el que la escisión se produce después de uno de los aminoácidos hidrófobos en P1 y de tipo elastasa, con la escisión después de una Ala en P1. Para los fines de la presente invención, la actividad proteasa se determina de acuerdo con el procedimiento que se describe en "Materiales y métodos", más adelante. Las variantes de subtilisina de la presente invención tienen al menos un 20 %, p. ej., al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, y al menos un 100 % de la actividad proteasa del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 o 4.

25 Propiedad mejorada: La expresión "propiedad mejorada" significa una característica asociada con una variante que está mejorada en comparación con la precursora o en comparación con una proteasa con SEQ ID NO: 2, o en comparación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas. Dichas propiedades mejoradas incluyen, pero no se limitan a rendimiento de lavado, actividad proteasa, perfil de actividad térmico, termoestabilidad, perfil de actividad de pH, estabilidad de pH, especificidad de sustrato/cofactor, propiedades superficiales mejoradas, especificidad de sustrato, especificidad de producto, estabilidad aumentada, p. ej., estabilidad quelante o solubilidad en presencia de biomasa pretratada, estabilidad mejorada en condiciones de almacenamiento y estabilidad química.

35 Estabilidad química mejorada: La expresión "estabilidad química mejorada" se define en el presente documento como una enzima variante que presenta retención de la actividad enzimática tras un periodo de incubación en presencia de una o unas sustancias químicas, bien de origen natural, o bien sintética, lo cual reduce la actividad enzimática de la enzima precursora. La estabilidad química mejorada también puede dar como resultado variantes con mejor capacidad para catalizar una reacción en presencia de dichas sustancias químicas. En un aspecto particular de la presente invención la estabilidad química mejorada es una estabilidad mejorada en un detergente, en particular, en un detergente líquido. La estabilidad detergente mejorada es, en particular, una estabilidad mejorada de la actividad alfa amilasa cuando se mezcla una variante de la alfa amilasa de la presente invención dentro de una formulación de detergente líquido que comprende un agente quelante, el líquido también incluye geles o una pasta. La formulación de detergente líquido puede referirse a detergente concentrado que se añade durante un proceso de lavandería o un proceso automatizado de lavado de vajillas o a un detergente diluido tal como una solución de lavado, es decir, una solución acuosa a la cual se añade el detergente concentrado.

45 En la presente invención, los detergentes líquidos son particularmente útiles como detergentes líquidos de lavandería.

50 Estabilidad: El término "estabilidad" incluye estabilidad de almacenamiento y estabilidad durante el uso, p. ej., durante un proceso de lavado, y refleja la estabilidad de la proteasa como una función del tiempo, p. ej., cuánta actividad se retiene cuando la proteasa se mantiene en solución, en particular, en una solución detergente. La estabilidad está incluida por muchos factores, p. ej., pH, temperatura, composición detergente, p. ej., cantidad de adyuvante de detergencia, tensioactivos, etc.

55 Rendimiento de lavado mejorado: La expresión "rendimiento de lavado mejorado" se define en el presente documento como una variante de proteasa o una composición detergente que comprende dicha variante de proteasa que presenta una alteración del rendimiento de lavado en relación con el rendimiento de lavado de la subtilisina precursora o de la composición detergente correspondiente, en relación con una proteasa con SEQ ID NO: 2 o la correspondiente composición detergente, o en relación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas o la correspondiente composición detergente, p. ej., mediante una mayor eliminación de manchas, lo cual se prefiere particularmente. La expresión "rendimiento de lavado" incluye rendimiento de lavado en lavandería pero también, p. ej., en el lavado de vajillas. El rendimiento de lavado puede cuantificarse como se describe en la definición de "rendimiento de lavado" en el presente documento.

65 Actividad proteasa mejorada: La expresión "actividad proteasa mejorada" se define en el presente documento como una actividad proteasa alterada (como se define anteriormente) de una variante de proteasa que presenta una alteración de la actividad en relación (o en comparación) con la actividad de la subtilisina precursora, o en

comparación con una proteasa con SEQ ID NO: 2, o en relación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas, mediante una mayor conversión de proteína.

5 Polipéptido maduro: La expresión "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y de cualquier modificación postraduccional, tal como procesamiento del N terminal, truncamiento del C terminal, glucosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro corresponde a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4.

10 Secuencia codificante del polipéptido maduro: La expresión "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad proteasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro son los nucleótidos 322 a 1146 de SEQ ID NO: 1 basada en el SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6)] que predice los nucleótidos 1 a 91 de SEQ ID NO: 1, codifica un péptido señal.

15 En un aspecto, el polipéptido maduro son los nucleótidos 577 a 1140 de SEQ ID NO: 3 basada en el SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6)] que predice los nucleótidos 1 a 81 de SEQ ID NO: 3, codifica un péptido señal.

20 Precursor: El término "precursor" significa una proteasa a la cual se efectúa una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. Por tanto, el precursor es una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más, p. ej., dos o más de dichas posiciones especificadas. Se entenderá, que en el presente contexto de expresión "que tiene secuencia de aminoácidos idéntica" se relaciona con un 100 % de identidad de secuencia. El precursor puede ser un polipéptido de origen natural (tipo silvestre) o una variante del mismo. En una realización particular el precursor es una proteasa con al menos un 60 % de identidad, tal como menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % de identidad con un polipéptido con la SEC ID NO: 2 o 4.

35 Identidad de secuencia: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia" Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos 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 versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por hueco abierto de 10, penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). El resultado de salida de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la forma siguiente:

$$\text{(Restos idénticos x 100)} / \text{(Longitud del alineamiento - Número total de huecos en el alineamiento)}$$

45 Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, citado anteriormente) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, citado anteriormente), preferentemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por hueco abierto de 10, penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de NCBI NUC4.4). El resultado de salida de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la forma siguiente:

$$\text{(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)} / \text{(Longitud del alineamiento - Número total de huecos en el alineamiento)}$$

55 Variante sustancialmente pura: La expresión "variante sustancialmente pura" significa una preparación que contiene como máximo un 10 %, como máximo un 8 %, como máximo un 6 %, como máximo un 5 %, como máximo un 4 %, como máximo un 3 %, como máximo un 2 %, como máximo un 1 %, y como máximo un 0,5 % en peso de otro material de polipéptido con el que se asocia de forma nativa o recombinante. Preferentemente, la variante es pura en al menos un 92 %, p. ej., pura en al menos un 94 %, pura en al menos un 95 %, pura en al menos un 96 %, pura en al menos un 97 %, pura en al menos un 98 %, al menos un 99 %, pura en al menos un 99,5 %, y pura en un 100 % en peso del material de polipéptido presente en la preparación. Las variantes de la presente invención están preferentemente en una forma sustancialmente pura. Esto puede lograrse, por ejemplo, preparando la variante mediante métodos recombinantes bien conocidos o mediante métodos de purificación clásicos.

65 Variante: El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad proteasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o eliminación, en una o más (una o varias) posiciones en comparación con su

precursor que es una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas. Una sustitución significa un reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una eliminación significa la retirada de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir aminoácidos, p. ej., 1 a 10 aminoácidos, tal como 9 aminoácidos, tal como 8 aminoácidos, tal como 7 aminoácidos, tal como 6 aminoácidos, tal como 5 aminoácidos, tal como 4 aminoácidos, preferentemente 1-3 aminoácidos, más preferentemente 1-2 aminoácidos y lo más preferiblemente dos aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

Rendimiento de lavado: La expresión "rendimiento de lavado" se usa como la capacidad de una enzima o detergente para eliminar manchas presentes en el objeto que se va a limpiar durante, p. ej., el lavado, tal como lavandería o la limpieza de una superficie dura. La mejoría en el rendimiento de lavado puede cuantificarse calculando el llamado valor de intensidad (Int) que se define en el ensayo AMSA tal como se describe en Material y métodos en el presente documento. Véase también la prueba de rendimiento de lavado en el ejemplo 2 del presente documento. Además, el rendimiento de lavado puede determinarse mediante la prueba de lavado de referencia que se describe más adelante.

Proteasa de tipo silvestre: La expresión "proteasa de tipo silvestre" significa una proteasa expresada por un organismo de origen natural, tal como una bacteria, arquea, levadura, hongo, vegetal o animal que se encuentra en la naturaleza. Un ejemplo de proteasa de tipo silvestre es BPN', es decir, la SEQ ID NO: 2 o savinasa (SEC ID NO: 4).

Convenciones para la designación de variantes

Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro que se desvela en la SEQ ID NO: 2 se usa para determinar el resto de aminoácido correspondiente en otra subtilisina. La secuencia de aminoácidos de otra subtilisina se alinea con el polipéptido maduro que se desvela en la SEQ ID NO: 2, y se basa en el alineamiento; el número de posición de aminoácido correspondiente a cualquier resto de aminoácido en el polipéptido maduro que se desvela en la SEQ ID NO: 2 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 versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por hueco abierto de 10, penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62).

La identificación del resto de aminoácido correspondiente en otra subtilisina puede determinarse mediante un alineamiento de múltiples secuencias de polipéptido usando varios programas informáticos que incluyen, pero no se limitan a, MUSCLE (comparación de secuencias múltiples por documentación-observación *-multiple sequence comparison by log-expectation-*); 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), usando sus respectivos parámetros por defecto.

Cuando la otra enzima ha diferido del polipéptido maduro de SEQ ID NO: de modo que la comparación basada en la secuencia tradicional no puede detectar su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), pueden usarse otros algoritmos de comparación de secuencia por pares. Puede alcanzarse mayor sensibilidad en la búsqueda basada en la secuencia usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias (perfiles) de polipéptidos para buscar bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso repetitivo de búsqueda en bases de datos y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Puede lograrse una sensibilidad aún mayor si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructura de proteínas. Los programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineamiento estructural, y potenciales de solvatación) como entrada a una red neural que predice el plegamiento estructural para una secuencia de búsqueda. De forma similar, Puede usarse el método de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP. Estos alineamientos pueden usarse a su vez para generar modelos de homología para el polipéptido, y puede evaluarse la precisión de dichos modelos usando una variedad de herramientas desarrolladas para dicho fin.

Para las proteínas de estructura conocida, se dispone de varias herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias SCOP de proteínas se han alineado estructuralmente, y dichos alineamientos están accesibles y pueden descargarse. Pueden alinearse dos o más estructuras de proteínas usando una variedad de algoritmos tales el alineamiento de matriz de distancias (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos puede utilizarse adicionalmente para buscar una estructura de interés en bases de datos de

estructuras con el fin de descubrir posibles homólogos estructurales (p. ej., Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

5 Al describir las variantes de la presente invención, se ha adaptado la nomenclatura que se describe más adelante para la facilidad de referencia. Se emplea la abreviatura de los aminoácidos de una sola letra o de tres letras aceptada por la IUPAC.

10 Sustituciones. Para la sustitución de un aminoácido se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de la treonina de la posición 226 con alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples se separan mediante signos de suma ("+"), p. ej., "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411 F", que representan sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

15 Eliminaciones. Para la eliminación de un aminoácido se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, *. Por consiguiente, la eliminación de la glicina de la posición 195 se designa como "Gly195*". Las eliminaciones múltiples se separan mediante signos de suma ("+"), p. ej., "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

20 Inserciones. Para la inserción de un aminoácido se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Por consiguiente, la inserción de lisina después de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195GlyLys" o "G195GK". Una inserción de múltiples aminoácidos se designa como [Aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado n.º 1, aminoácido insertado n.º 2, etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o "G195GKA".

25 En dichos casos, el(los) resto(s) de aminoácido(s) insertado(s) se numeran mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del resto de aminoácido que precede a el(los) resto(s) de aminoácido(s) insertado(s). En el ejemplo anterior, la secuencia sería, por tanto:

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

30 Alteraciones múltiples. Las variantes que comprenden alteraciones múltiples se separan mediante signos de suma ("+"), p. ej., "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E" que representan una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

35 Alteraciones diferentes. Cuando pueden introducirse alteraciones diferentes en una posición, las alteraciones diferentes se separan mediante una coma, p. ej., "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina y ácido glutámico. Por tanto, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las siguientes variantes:

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

Numeración de los restos/posiciones de aminoácidos

45 Si no se menciona nada más, la numeración de aminoácidos que se usa en el presente documento corresponde a la secuencia de subtilasa BPN' (BASBPN). Para descripción adicional de la secuencia BPN', véase la SEQ ID NO:2 o Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737.

En lo sucesivo, la expresión "correspondiente/que corresponde a" debe entenderse como que corresponde a una posición de la SEQ ID NO: 2, es decir, la numeración a lo largo del documento está de acuerdo con BPN'.

50 Descripción detallada de la invención

Los inventores han encontrado que el cambio de la carga global en las posiciones correspondientes a la posición 217 o 218 de SEQ ID NO: 2 daba como resultado variantes con mayor rendimiento de lavado en particular en manchas de huevo, haciendo, por tanto, a dichas variantes particularmente aplicables para las composiciones detergentes. El aumento de la carga negativa en ambas posiciones correspondientes a la posición 217 y 218, es decir, mediante la sustitución del aminoácido que ocupa la posición 217 y del aminoácido que ocupa la posición 218 con un aminoácido que está cargado más negativamente da como resultado variantes de proteasa con propiedades mejoradas en comparación con su precursor, p. ej., en comparación con la SEQ ID NO: 2, que son aplicables ventajosamente en las composiciones detergentes. En particular las variantes tienen mayor rendimiento de lavado en comparación con un precursor con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 2 con la mutación Y217L o en comparación con

un precursor con un único cambio de carga, bien en la posición 217 o bien en la 218. Aunque una única sustitución, bien en la posición 217 o bien en la 218, con un aminoácido mas cargado que el aminoácido sustituido puede proporcionar un efecto beneficioso sobre el rendimiento de lavado, este efecto fue más pronunciado cuando las dos posiciones 217 y 218 se hicieron cargadas más negativamente en comparación con la SEC ID NO: 2, es decir, sustituyendo los aminoácidos correspondientes a 217 y 218 de la SEC ID NO: 2 en la proteasa precursora con cualquiera de los aminoácidos cargados negativamente D, E. Los inventores encontraron que se obtiene mayor rendimiento de lavado cuando las sustituciones conducen a un cambio global de la carga en las dos posiciones correspondientes a 217 y 218 de SEC ID NO: 2. Por tanto, las variantes con la misma carga en las posiciones 217 y 218, p. ej., una carga negativa en ambas posiciones tales como Y217E+N218D mostraron mayor rendimiento en comparación con el precursor, con una proteasa con SEQ ID NO: 2 o en relación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas. Hacer a las proteasas en cualquier caso cargadas más negativamente en posiciones correspondientes a las posiciones 217 o 218 de la SEC ID NO: 2 da como resultado variantes que son más hidrófilas. Por tanto, de acuerdo con otra realización, las variantes de proteasa de las composiciones detergentes de acuerdo con la invención son más hidrófilas en las posiciones correspondientes a las posiciones 217 y 218 de la SEC ID NO: 2 en comparación con el precursor, con una proteasa con SEQ ID NO: 2 o en relación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas.

Por tanto, un aspecto de la invención se relaciona con composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilisina que comprenden cualquiera de las sustituciones correspondientes a Y217D, Y217E, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.

En una realización, la variante en una composición detergente de acuerdo con la invención es un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 o 3 o una secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4. En una realización, la variante en una composición detergente de acuerdo con la invención es un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 1 o 3.

Otra realización tiene que ver con un método para producir una composición detergente que comprende la etapa de añadir una variante de subtilisina que se ha obtenido mediante un método que comprende introducir en una subtilisina precursora que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4, que corresponde las sustituciones a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D o E y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones. Por supuesto, preferentemente, la variante tiene actividad proteasa. Un aspecto particular tiene que ver con un método para producir una composición detergente que comprende la etapa de añadir una variante de subtilisina que se ha obtenido mediante un método que comprende introducir en una subtilisina precursora las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D o E, en la que la variante es una variante de una proteasa subtilisina precursora seleccionada del grupo que consiste en:

a. un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4;

b. un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID NO: 1 o 3, o la secuencia de ADNc del mismo.

Otro aspecto de la invención se relaciona con una composición detergente que se ha obtenido mediante un método tal como se describe anteriormente.

En una realización la variante de proteasa de la composición detergente de la invención es una variante BPN' (SEQ ID NO: 2) que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D, E, la variante de subtilisina que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID N°: 2, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.

En otra realización más la variante de proteasa de la composición detergente de la invención es una variante BPN' que comprende cualquiera de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en [Y217D + N218D], [Y217E + N218E], [Y217D + N218E], [Y217E + N218D], al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos

un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

5 En otra realización particular la variante de proteasa de la composición detergente de la invención es una savinasa (SEQ ID NO: 4) que comprende las sustituciones correspondientes a L217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D, teniendo la variante de subtilisina al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, y en la que el número de alteraciones en la
 10 variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones. En otra realización la variante de proteasa de la composición detergente de la invención es una variante de savinasa que comprende cualquiera de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en [L217D + N218D], [L217E + N218E], [L217D + N218E], [L217E + N218D], al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido
 15 maduro de SEQ ID NO: 4.

En una realización la variante comprende una sustitución en una posición que corresponde a la posición 217 de SEQ ID NO: 2 con D y comprende además una sustitución en una posición que corresponde a la posición 218 de SEQ ID NO: 2 con D.
 20

En una realización la variante comprende una sustitución en una posición que corresponde a la posición 217 de SEQ ID NO: 2 con E y comprende además una sustitución en una posición que corresponde a la posición 218 de SEQ ID NO: 2 con D.

25 En una realización la variante comprende una sustitución en una posición que corresponde a la posición 217 de SEQ ID NO: 2 con D y comprende además una sustitución en una posición que corresponde a la posición 218 de SEQ ID NO: 2 con E.

30 En una realización la variante comprende una sustitución en una posición que corresponde a la posición 217 de SEQ ID NO: 2 con E y comprende además una sustitución en una posición que corresponde a la posición 218 de SEQ ID NO: 2 con E.

35 En un aspecto, la variante comprende o consiste en una alteración en una posición que corresponde a la posición 217. En otro aspecto, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 217 se sustituye con Asp, Glu, preferentemente con Asp. En otro aspecto, la variante comprende o consiste en la sustitución Y217D del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

40 En un aspecto, la variante comprende o consiste en una alteración en una posición que corresponde a la posición 218. En otro aspecto, el aminoácido en una posición que corresponde a la posición 218 se sustituye con Asp, Glu.

45 En un aspecto, la variante comprende o consiste en una alteración en una posición que corresponde a la posición 217 y una alteración en una posición que corresponde a la posición 218 en la que dichas posiciones 217 y 218 se sustituyen con Asp, Glu. En otro aspecto, la variante comprende o consiste en una alteración en una posición que corresponde a la posición 217 y una alteración en una posición que corresponde a la posición 218 en la que dichas posiciones 217 y 218 se sustituyen con Asp, Glu, y en la que la sustitución en la posición 217 y 218 es con el mismo aminoácido. Por tanto, en un aspecto la variante comprende o consiste en las sustituciones Y217D + N218D, Y217E + N218E. En otro aspecto, la variante comprende o consiste en una alteración en una posición que corresponde a la posición 217 y una alteración en una posición que corresponde a la posición 218 de SEQ ID NO: 2 con Asp, Glu, en la que la sustitución en la posición 217 y 218 no es con el mismo aminoácido y en la que la sustitución en la posición
 50 217 y 218 da como resultado un cambio global de la carga en estas dos posiciones. Por tanto, en un aspecto la variante comprende o consiste en las sustituciones Y217D + N218E, Y217E + N218D. Todas las variantes descritas anteriormente son particularmente aplicables en composiciones detergentes de acuerdo con la invención.

55 Por tanto, un aspecto de la invención tiene que ver con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D, E y en la que X y Z son el mismo aminoácido.

Un aspecto de la invención tiene que ver con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D, E, en la que X y Z son el mismo aminoácido y en la que X y Z son D.

60 Un aspecto de la invención tiene que ver con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D, E, en la que X y Z son el mismo aminoácido y en la que X y Z son E.

65 Un aspecto de la invención tiene que ver con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D, E, en la que X y Z no son el mismo aminoácido y en la que X es D y Z es E.

Un aspecto de la invención tiene que ver con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D, E, en la que X y Z no son el mismo aminoácido y en la que X es D y Z es E.

5 En otro aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones L217D y N218D del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4.

10 En otro aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones L217E y N218E del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones L217D y N218E del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4.

15 En otro aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones L217E y N218D del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4.

Las variantes de las composiciones detergentes de acuerdo con la invención pueden comprender además una o más alteraciones en una o más (p. ej., varias) de otras posiciones.

20 Los cambios de aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, esto es, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservativas que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; pequeñas eliminaciones, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tales como un resto amino terminal de metionina; un pequeño péptido engarzador de hasta 20-25 restos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como una cola de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

30 Los ejemplos de sustituciones conservativas están dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que no alteran por lo general la actividad específica se conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York. Son sustituciones comunes Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Asn/Gln, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Glu/Gln, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

40 De forma alternativa, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similar.

45 Por ejemplo, las variantes en las composiciones detergentes de acuerdo con la invención pueden comprender una alteración en las posiciones que corresponden a las posiciones 217 y 218 y comprender además una alteración en otra(s) posición(es) siempre que la alteración no afecte al rendimiento de la variante.

50 Los aminoácidos esenciales en un polipéptido pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis con barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en restos alternos de la molécula, y se analiza la actividad proteasa resultante en las moléculas mutantes resultantes para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también pueden determinarse mediante análisis físico de la estructura, determinada mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones, marcaje por fotoafinidad, junto con mutación de aminoácidos del supuesto sitio de contacto. 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. La identidad de los aminoácidos esenciales también puede inferirse a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado. Para BPN' (SEC ID NO: 2) la tríada catalítica que comprende los aminoácidos S221, H64, y D32 es esencial para la actividad proteasa de la enzima.

60 Las variantes pueden consistir en de 200 a 900 aminoácidos, p. ej., de 210 a 800, de 220 a 700, de 230 a 600, de 240 a 500, de 250 a 400, de 255 a 300, de 260 a 290, de 265 a 285, de 270 a 280 o 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279 o 280 aminoácidos.

En una realización, la variante tiene actividad catalítica mejorada en comparación con la enzima precursora.

65 En una realización, la variante tiene rendimiento de lavado mejorado en comparación con la subtilisina precursora o en comparación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas o en comparación con una proteasa con SEQ ID NO:

2, en la que el rendimiento de lavado se mide tal como se describe en el ejemplo 2 en "Material y métodos" en el presente documento.

En otra realización, la composición detergente que comprende la variante tiene un rendimiento de lavado mejorado en comparación con una composición detergente idéntica de otra forma con una proteasa que es la subtilisina precursora o con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas, o con una proteasa con SEQ ID NO: 2.

Proteasas precursoras

Las enzimas que escinden los enlaces amida en sustratos proteicos se clasifican como proteasas, o (indistintamente) peptidasas (véase Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms. W.H. Freeman and Company, San Francisco, capítulo 3).

Serina proteasas

Una serina proteasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos y en cuyo centro activo hay un resto de serina esencial (White, Handler y Smith, 1973 "Principles of Biochemistry," 5ª Edition, McGraw-Hill Book Company, NY, págs. 271-272).

Las serina proteasas bacterianas tienen pesos moleculares en el intervalo de los 20.000 a 45.000 Dalton. Se inhiben mediante fluorofosfato de diisopropilo. Hidrolizan ésteres terminales simples y tienen una actividad similar a la quimiotripsina eucariota, que también es una serina proteasa. Un término más restringido, proteasa alcalina, que abarca un subgrupo, refleja el alto pH óptimo de algunas de las serina proteasas, desde pH 9,0 a 11,0 (para revisión, véase Priest, 1977, Bacteriological Rev. 41:711-753).

Subtilasas

Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523, han propuesto un subgrupo de serina proteasas designado provisionalmente como subtilasas. Se han definido mediante análisis de homología de más de 170 secuencias de aminoácidos de serina proteasas previamente denominadas como proteasas de tipo subtilisina. Una subtilisina solía definirse previamente como una serina proteasa producida por bacterias Gram positivas u hongos, y, de acuerdo con Siezen et al., ahora es un subgrupo de las subtilasas. Se ha identificado una amplia variedad de subtilasas, y se ha determinado la secuencia de aminoácidos de una serie de subtilasas. Para una descripción más detallada de dichas subtilasas y de sus secuencias de aminoácidos se hace referencia a Siezen et al. (1997).

Un subgrupo de subtilasas, I-S1 o subtilisinas "verdaderas", comprende las subtilisinas "clásicas", tales como subtilisina 168 (BSS168), subtilisina BPN', subtilisina Carlsberg (ALCALASE®, NOVOZYMES A/S), y subtilisina DY (BSSDY).

Siezen et al. (citado anteriormente) reconocen un subgrupo más de subtilasas, I-S2 o subtilasas de alcalinidad elevada. Las proteasas del subgrupo I-S2 se describen como subtilisinas muy alcalinas y comprende enzimas tales como subtilisina PB92 (BAALKP) (MAXACAL®, Genencor International Inc.), subtilisina 309 (SAVINASE®, NOVOZYMES A/S), subtilisina 147 (BLS147) (ESPERASE®, NOVOZYMES A/S), y elastasa alcalina YaB (BSEYAB). BPN' es subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens*. BPN' tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Subtilisinas

Las subtilisinas son serina proteasas de la familia S8, en particular de la subfamilia S8A, tal como se define mediante la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=S8>). BPN' y savinasa tienen los números MEROPS S08.034 y S08.003, respectivamente.

Subtilisina precursora

La expresión "subtilisina precursora" describe una subtilasa definida de acuerdo con Siezen et al. 1991 y 1997). Para detalles adicionales, véase la descripción de "Subtilasas" anterior. Una subtilisina precursora también puede ser una subtilasa aislada de una fuente natural, en la que se han efectuado modificaciones posteriores al tiempo que retiene las características de una subtilasa. Además, una subtilisina precursora puede ser una subtilasa que se ha preparado mediante la técnica de reordenamiento de ADN, tal como describen J.E. Ness et al., Nature Biotechnology, 17, 893-896 (1999).

De forma alternativa, la expresión "subtilisina precursora" puede denominarse "subtilasa de tipo silvestre".

Para referencia, se proporciona una tabla de los acrónimos de diversas subtilasas mencionadas en el presente documento, para acrónimos adicionales, véanse Siezen et al., Protein Engng: 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523.

5

Tabla III

Organismo	Enzima	Acrónimo
Bacterias: Gram positivas		
<i>Bacillus subtilis</i> 168	subtilisin 1168, apr	BSS168
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	subtilisina BPN' (NOVO)	BASBPN
<i>Bacillus subtilis</i> DY	subtilisina DY	BSSDY
<i>Bacillus licheniformis</i>	subtilisina Carlsberg	BLSCAR
<i>Bacillus lentus</i>	subtilisina 309	BLSAVI
<i>Bacillus lentus</i>	subtilisina 147	BLS147
<i>Bacillus alcalophilus</i> PB92	subtilisina PB92	BAPB92
<i>Bacillus</i> YaB	elastasa alcalina YaB	BYSYAB
<i>Bacillus</i> sp. NKS-21	subtilisina ALP I	BSAPRQ
<i>Bacillus</i> sp. G-825-6	subtilisina Sendai	BSAPRS
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	thermitasa	TVTHER

Modificación(es) de una subtilasa

10 El término "modificación(es)" que se usa en el presente documento se define para incluir la modificación química de una subtilasa, así como la manipulación genética del ADN que codifica una subtilasa. La(s) modificación(s) puede ser reemplazo(s) de la(s) cadena(s) lateral(es) del aminoácido, sustitución(es), eliminación(es) y/o inserción(es) dentro de o en el(los) aminoácido(s) de interés.

15 Variante de subtilisina

El término "variante" y la expresión "variante de subtilisina" se definen anteriormente.

20 Secuencias de subtilasa homólogas

La homología entre dos secuencias de aminoácidos en este contexto se describe mediante el parámetro "identidad" para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch tal como se describe anteriormente. El resultado de salida de rutina es, además del alineamiento de aminoácidos, el cálculo del "porcentaje de identidad" entre las dos secuencias.

25 Basándose en esta descripción, es rutinario para un experto en la técnica identificar subtilasas homólogas adecuadas, que pueden modificarse de acuerdo con la invención

30 Las variantes de subtilisina precursora sustancialmente homólogas pueden tener una o más (varias) sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos, en el presente contexto la expresión "una o más" se usa indistintamente con el término "varias". Estos cambios son preferentemente de naturaleza menor, esto es, sustituciones de aminoácidos conservativas tal como se describe anteriormente y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento tridimensional y/o la actividad de la proteína o polipéptido; pequeñas eliminaciones, típicamente de uno a alrededor de 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tales como un resto amino terminal de metionina, un pequeño péptido engarzador de hasta alrededor de 20-25 restos, o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como una cola de polihistidina, o protein A (Nilsson et al., 1985, EMBO J. 4: 1075; Nilsson et al., 1991, Methods Enzymol. 198: 3. Véase también, en general, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

40 Aunque los cambios descritos anteriormente son preferentemente de naturaleza menor, dichos cambios también pueden ser de naturaleza sustantiva tal como fusión de polipéptidos mayores, de hasta 300 aminoácidos, o más como extensiones tanto amino o como carboxilo terminales.

45 La subtilisina precursora puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o una variante alélica de la misma. En un aspecto, la subtilisina precursora comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.

La subtilisina precursora puede ser (a) un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4; o (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID NO: 1 o 3.

5 En un aspecto, el precursor tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 y 4 de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, o 100 %, el cual tiene actividad proteasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, del polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4. En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, del polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4 en la que las variantes han retenido sus propiedades mejoradas.

15 En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o 4. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 275 de la SEC ID NO: 2. En otro aspecto más, el precursor comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 269 de la SEC ID NO: 4.

20 Puede explorarse ADN que hibride con las sondas descritas anteriormente y que codifique un precursor en una biblioteca de ADN genómico o ADNc preparada a partir de dichas otras cepas. El ADN genómico o de otro tipo de dichas otras cepas puede separarse mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado pueden transferirse a e inmovilizarse sobre nitrocelulosa u otro material portador adecuado. A fin de identificar un clon o ADN que hibride con las SEQ ID NO: 1 o 3 o una subsecuencia de las mismas, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

25 Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde a (i) las SEQ ID NO: 1 o 3; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID NO: 1 o 3; (iii) una secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4; (iv) el complemento de longitud completa de las mismas; o (v) una subsecuencia de las mismas; en condiciones de muy baja a muy alta rigurosidad. Las moléculas con las que hibrida la sonda de ácido nucleico en estas condiciones puede detectarse usando, por ejemplo, una película de rayos X o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

35 En un aspecto, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID NO: 1 o 3. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es un fragmento de 80 a 1140 nucleótidos de longitud de SEQ ID NO: 1 o 3, p. ej., de 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o 1100 nucleótidos de longitud. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID NO: 2 o 4; el polipéptido maduro de la misma; o un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 1 o 3 o una secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4 respectivamente.

40 En otra realización, el precursor está codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID NO: 1 o 3 de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % o un 100 %.

45 El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el cual una región de un polipéptido se fusiona con el extremo N o el extremo C de una región de otro polipéptido.

50 El precursor puede ser un polipéptidos de fusión o un polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido se fusiona con el extremo N o el extremo C del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido con un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en fase y que la expresión de los polipéptidos de fusión esté bajo el control del(los) mismo(s) promotor(es) y terminador(es). Los polipéptidos de fusión también pueden construirse usando tecnología de inteínas en la cual los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

55 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 no se limitan a, los sitios que se desvelan en 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.

65 El precursor puede obtenerse a partir de organismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, la expresión "obtenido a partir de" tal como se usa en el presente documento en conexión con una fuente dada

significará que el precursor codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la cual se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el precursor se secreta extracelularmente.

5 El precursor puede ser una proteasa bacteriana. Por ejemplo, el precursor puede ser un polipéptido bacteriano Gram positivo tal como una proteasa de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, o *Streptomyces*, o un polipéptido bacteriano Gram negativo tal como una proteasa de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, o *Ureaplasma*.

10 En un aspecto, el precursor es una proteasa 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*.

15 En un aspecto, el precursor es una proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, p. ej., la proteasa de SEQ ID NO: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

En otro aspecto, el precursor es una proteasa de *Bacillus lentus*, p. ej., la proteasa de SEQ ID NO: 4 o el polipéptido maduro de la misma.

20 Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

25 El precursor puede identificarse y obtenerse a partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., suelo, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente a partir de materiales naturales (p. ej., suelo, abonos, agua, etc.) usando las sondas mencionadas anteriormente. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales se conocen bien en la técnica. Después puede obtenerse un polinucleótido que codifica un precursor explorando de forma similar una biblioteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o de una muestra de ADN mixto. Una vez que el polinucleótido que codifica un precursor se ha detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido puede aislarse o clonarse utilizando técnicas que son conocidos por los expertos habituales en la técnica (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, 1989, citado anteriormente).

35 Preparación de variantes

Las variantes pueden prepararse usando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis dirigida, construcción de gen sintético, construcción de gen semisintético, mutagénesis aleatoria, reordenamiento, etc.

40 La mutagénesis dirigida es una técnica en la cual se introducen una o más (p. ej., varias) mutaciones en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el precursor.

45 La mutagénesis dirigida puede conseguirse *in vitro* mediante PCR que implica el uso de cebadores de oligonucleótidos que contiene la mutación deseada. La mutagénesis dirigida también puede realizarse *in vitro* mediante mutagénesis de casete que implica la escisión mediante una enzima de restricción en un sitio del plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el precursor y el posterior ligamiento de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite que los extremos cohesivos del plásmido y el inserto se ligen entre sí. Véase p. ej., Scherer and Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 76: 4949-4955; y Barton *et al.*, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

50 La mutagénesis dirigida también puede conseguirse *in vivo* mediante métodos conocidos en la técnica. Véase p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0171154; Storici *et al.*, 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren *et al.*, 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16.

55 En la presente invención puede usarse cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida. Existen numerosos *kits* comerciales disponibles que pueden usarse para preparar variantes.

60 La construcción de gen sintético conlleva la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis génica puede realizarse utilizando una serie de técnicas, tales como la tecnología basada en microchip múltiple descrita por Tian *et al.* (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares en las que los oligonucleótidos se sintetizan y se ensamblan en chips fotoprogramables microfluidos.

65 Pueden efectuarse sustituciones, eliminaciones y/o inserciones individuales y analizarse usando métodos de mutagénesis, recombinación, y/o reordenamiento, seguidos de un procedimiento importante de exploración, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci.

EE.UU. 86: 2152-2156; el documento WO 95/17413; o el documento WO 95/22625. Otros métodos que pueden usarse incluyen PCR propensa a errores, presentación en fagos (p. ej., Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; la patente de EE.UU. n.º 5.223.409; el documento WO 92/06204) y mutagénesis de región dirigida (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

Los métodos de mutagénesis/ recombinación pueden combinarse con métodos de exploración automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de los péptidos mutados clonados que expresan las células anfitrionas (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas mutadas de ADN que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células anfitrionas y secuenciarse rápidamente usando métodos convencionales en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de restos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

La construcción de gen semisintético se consigue combinando aspectos de la construcción de gen sintético, y/o mutagénesis dirigida, y/o mutagénesis aleatoria, y/o reordenamiento. La construcción de gen semisintético está tipificada mediante un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. Pueden, por tanto, sintetizarse *de novo* regiones definidas de genes, mientras que otras regiones pueden amplificarse usando cebadores de mutagénesis dirigida, mientras que otras regiones más pueden someterse a amplificación por PCR propensa a error o PCR no propensa a error. Después pueden reordenarse subsecuencias de polinucleótido.

Caracterización adicional de composiciones detergentes de acuerdo con la invención

De acuerdo con la invención, se ha encontrado sorprendentemente que las composiciones detergentes tal como se describe anteriormente, es decir, composiciones detergentes que comprenden una variante de proteasa tal como se describe, presentan un rendimiento de lavado ventajoso, preferentemente un rendimiento de lavado mejorado, especialmente con respecto a manchas sensibles a proteasa, particularmente manchas de huevo.

La composición detergente de la presente invención puede formularse, por ejemplo, como una composición detergente para lavandería a mano o a máquina incluyendo una composición aditiva para lavandería adecuada para el pretratamiento de telas manchadas y una composición suavizante de tela añadida en el aclarado, o formularse como una composición detergente para su uso en operaciones domésticas generales de limpieza de superficies duras, o formularse para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina. Preferentemente, la composición detergente de acuerdo con la invención es una composición detergente para lavandería o una composición para lavado de vajillas, preferentemente una composición para lavado de vajillas a máquina.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona un aditivo detergente que comprende un polipéptido de la presente invención tal como se describe en el presente documento.

En una realización preferida adicional, la composición detergente de acuerdo con la invención comprende la variante de proteasa en una cantidad de 1×10^{-8} -10 de porcentaje en peso (p), de 0,00001-2 % p, de 0,001 a 1 % p, de 0,007 a 0,8 % p, de 0,025 a 0,5 % p y particularmente preferida de 0,04 a 0,38 % p, sobre la base del contenido total de proteína de la variante de proteasa. La concentración de proteína puede determinarse usando métodos conocidos, por ejemplo, el procedimiento del ABC (ácido bicinconínico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de Biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), págs. 751-766).

En otra realización preferida, la composición detergente de acuerdo con la invención es una composición detergente líquida.

En una realización preferida adicional, la composición detergente se caracteriza por que presenta un rendimiento de lavado mejorado. Preferentemente, dicho rendimiento de lavado mejorado se determina como se indica en las definiciones en el presente documento, especialmente calculando el llamado valor de intensidad (Int) definido en el ensayo AMSA tal como se describe en Materiales y métodos en el presente documento (véase también la prueba del rendimiento de lavado en el ejemplo 2 en el presente documento) o mediante la prueba de lavado de referencia que se describe posteriormente.

Prueba de lavado de referencia:

En la prueba de lavado de referencia, el rendimiento de lavado se determina en un sistema de lavado que contiene una composición detergente a una proporción de dosificación de entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de licor de lavado así como la proteasa. Las composiciones detergentes para comparar contienen la misma cantidad de la proteasa respectiva sobre la base del contenido total de proteína, preferentemente manteniendo una cantidad de 5 mg de proteasa por litro de licor de lavado. El rendimiento de lavado se determina con respecto a las manchas de huevo, en particular con respecto a una o más de las siguientes manchas:

- huevo entero con pigmento sobre algodón: producto n.º C-S-37 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen, Países Bajos,

- huevo entero con pigmento sobre algodón/poliéster: producto n.º PC-S-37 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen, Países Bajos,
- huevo entero con pigmento, envejecido mediante calentamiento, sobre algodón/poliéster: producto n.º PC-S-39 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen, Países Bajos,

5 midiendo la blancura de los tejidos lavados, realizándose el procedimiento de lavado durante al menos 30 minutos, opcionalmente 60 minutos, una temperatura de 40 °C, y teniendo el agua una dureza entre 15,5 y 16,5° (grados alemanes de dureza).

10 La composición detergente líquida preferida para dicho sistema de lavado tiene la siguiente composición (todas las indicaciones en porcentaje en peso): de 0,3 a 0,5 % de goma de xantano, 0,2 a 0,4 % de agente antiespumante, 6 a 7 % de glicerol, 0,3 a 0,5 % de etanol, 4 a 7 % de FAEOS (siglas en inglés de sulfato de éter de alcohol graso), 24 a 28 % de tensioactivos no iónicos, 1 % de ácido bórico, 1 a 2 % de citrato de sodio (dihidrato), 2 a 4 % de sosa, 14 a 16 % de ácido graso de coco, 0,5 % de HEDP (siglas en inglés de ácido 1-hidroxietano-(1,1-difosfónico)), 0 a 0,4 %
15 de PVP (polivinilpirrolidona), 0 a 0,05 % de blanqueantes ópticos, 0 a 0,001 % de colorante, resto de agua desionizada. La proporción de dosificación del agente de lavado líquido está preferentemente entre 4,5 y 6,0 gramos por litro de licor de lavado, por ejemplo 4,7, 4,9, o 5,9 gramos por litro de licor de lavado. El lavado se produce preferentemente en un intervalo de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferentemente entre pH 8 y pH 9.

20 La composición detergente en polvo preferida para dicho sistema de lavado tiene la siguiente composición (todas las indicaciones en porcentaje en peso): 10 % de alquilbencenosulfonato lineal (sal sódica), 1,5 % de sulfato de alcohol graso C12 a C18 (sal sódica), 2,0 % de alcohol graso C12 a C18 con 7 EO, 20 % de carbonato sódico, 6,5 % de hidrogenocarbonato sódico, 4,0 % de disilicato de sodio amorfo, 17 % de peroxihidrato de carbonato sódico, 4,0 % de TAED, 3,0 % de poliácrlato, 1,0 % de carboximetilcelulosa, 1,0 % de fosfonato, 25 % de sulfato sódico; resto:
25 inhibidores de espuma opcionales, blanqueantes ópticos, aromas, y, si procede, agua hasta hacer el 100 %. La proporción de dosificación del agente de lavado en polvo está preferentemente entre 5,5 y 7,0 gramos por litro de licor de lavado, por ejemplo 5,6, 5,9, o 6,7 gramos por litro de licor de lavado. El lavado se produce preferentemente en un intervalo de pH entre pH 9 y pH 11.

30 De acuerdo con la presente invención se prefiere si se usa el agente de lavado líquido mencionado anteriormente, tal como se indica, para determinar el rendimiento de lavado mediante la prueba de lavado de referencia.

La blancura, es decir, el blanqueamiento de las manchas, se determina como una indicación del rendimiento de lavado, preferentemente usando métodos de medición ópticos, preferentemente de forma fotométrica. Un dispositivo
35 adecuado para esto es, por ejemplo, el espectrómetro Minolta CM508d. Los dispositivos usados para la medición se calibran normalmente de antemano usando un blanco patrón, preferentemente un blanco patrón proporcionado con la unidad.

La(s) enzima(s) de las composiciones detergentes de la invención, especialmente las variantes de proteasa que se describen en el presente documento, pueden estabilizarse usando agentes estabilizadores convencionales p. ej., un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado del ácido bórico, p. ej., un éster borato aromático, o un derivado del ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenilborónico, y la composición puede formularse tal como se describe, por ejemplo, en los documentos WO92/19709 y WO92/19708 o las variantes de acuerdo con la invención pueden estabilizarse usando aldehídos o
45 cetonas de péptido tal como se describe en los documentos WO2005/105826 y WO2009/118375.

Una composición detergente de acuerdo con la invención puede comprender además uno o más compuestos peroxi. Dichos compuestos peroxi presentes opcionalmente en las composiciones, los cuales pueden considerarse en particular, son perácidos orgánicos o sales perácidas de ácidos orgánicos, tales como ácido ftalimidopercaproico, ácido perbenzoico o sales de ácido diperdodecanodioico, peróxido de hidrógeno y sales inorgánicas que liberan
50 peróxido de hidrógeno en las condiciones de lavado, tales como perborato, percarbonato y/o persulfato. También puede producirse en este caso peróxido de hidrógeno con la ayuda de un sistema enzimático, es decir, una oxidasa y su sustrato. Cuando se van a usar compuestos peroxi sólidos, pueden usarse en forma de polvos o gránulos, que, en principio, también pueden encapsularse de manera conocida. Se prefieren particularmente el percarbonato de metal alcalino, perborato de metal alcalino monohidrato, perborato de metal alcalino tetrahidrato o peróxido de hidrógeno en forma de soluciones acuosas que contienen de 3 % p a 10 % p de peróxido de hidrógeno. Los compuestos peroxi están presente preferentemente en los agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención en cantidades de hasta un 50 % p, en particular, de 5 % p a 30 % p.

60 Aparte de la variante de proteasa para usar de acuerdo con la invención, las composiciones detergentes de acuerdo con la invención, que pueden, en particular, tomar la forma de sólidos pulverulentos, partículas poscomprimidas, soluciones o suspensiones homogéneas, pueden contener, en principio, cualquier ingrediente conocido y convencional en dichas composiciones. las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener en particular sustancias adyuvantes de detergencia, tensioactivos superficialmente activos, disolventes orgánicos
65 miscibles en agua, enzimas, agentes secuestrantes, electrolitos, reguladores del pH, polímeros con efectos específicos, tales como polímeros desmanchantes, inhibidores de la transferencia de color, inhibidores de la

formación de color gris, principios activos poliméricos reductores de las arrugas e principios activos poliméricos conservadores de la forma, y sustancias auxiliares adicionales, tales como blanqueantes ópticos, reguladores de la espuma, activadores peroxi adicionales, colorantes y aromas.

Además de los ingredientes indicados anteriormente, una composición de acuerdo con la invención puede contener principios activos antimicrobianos convencionales con el fin de potenciar la acción de desinfección, por ejemplo, hacia microorganismos específicos. Dichos aditivos antimicrobianos están presentes preferentemente en los desinfectantes de acuerdo con la invención en cantidades de hasta un 10 % p, en particular, de 0,1 % p a 5 % p.

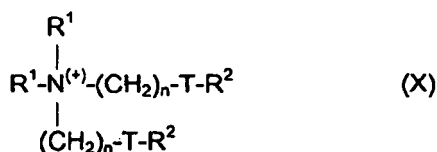
En una composición detergente de acuerdo con la invención, también pueden usarse activadores del blanqueamiento convencionales que forman ácido peroxicarboxílico o ácidos peroximídicos en condiciones de perhidrólisis y/o complejos de metales de transición activadores del blanqueamiento. El componente activador del blanqueamiento presente opcionalmente en particular en cantidades de 0,5 % p a 6 % p comprende compuestos Nor O-acilo usados convencionalmente, por ejemplo, alquilendiaminas poliáciladas, en particular tetraacetiletilendiamina, glicourilos acilados, en particular tetraacetilglicourilo, hidantoínas N-aciladas, hidrazidas, triazoles, urazoles, dicetopiperazinas, sulfurilamidas y cianuratos, además, anhídridos carboxílicos, en particular anhídrido ftálico, ésteres de ácido carboxílico, en particular isononanoilfenolsulfonato, y derivados acilados de azúcar, en particular pentaacetilglucosa, junto con derivados catiónicos de nitrilo, tales como sales de acetonitrilo trimetilamonio. Con el fin de evitar la interacción con compuestos durante el almacenamiento, los activadores del blanqueamiento pueden haberse recubierto de manera conocida con sustancias de cubierta o granularse, siendo opciones particularmente preferidas tetraacetiletilendiamina granulada con la ayuda de carboximetilcelulosa y teniendo un tamaño medio de grano de 0,01 mm a 0,8 mm, 1,5-diacetil-2,4-dioxohexahidro-1,3,5-triazina granulada, y/o acetonitrilo trialquilamonio formulado en forma particulada. Dichos activadores del blanqueamiento están presentes preferentemente en composiciones de lavado o limpieza en cantidades de hasta un 8 % p, en particular de 2 % p a 6 % p, en cada caso en relación con la composición entera.

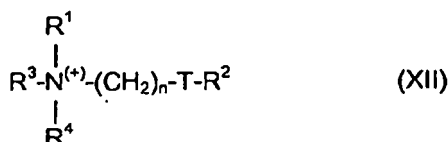
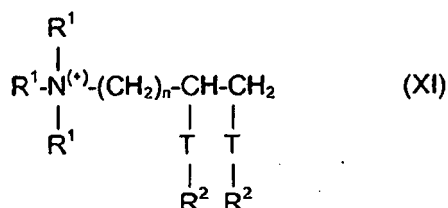
Las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener uno o más tensioactivos, considerándose en particular tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos y mezclas de los mismos, pero estando también presentes posiblemente tensioactivos catiónicos y/o anfóteros. Los tensioactivos no iónicos adecuados son en particular alquil glucósidos y productos de etoxilación y/o propoxilación de alquilglucósidos o alcoholes lineales o ramificados que tienen en cada caso de 12 a 18 átomos de C en el resto alquilo y de 3 a 20, preferentemente de 4 a 10, los grupos alquil éter. Además pueden usarse los productos correspondientes de etoxilación y/o propoxilación de N-alquilaminas, dioles vecinales, ésteres de ácido graso y aminas de ácido graso, que corresponden con respecto al resto alquilo de los derivados de alcohol de cadena larga indicados, de de alquilfenoles que tienen de 5 a 12 átomos de C en el resto alquilo.

Los tensioactivos aniónicos adecuados son en particular jabones y los que contienen grupos sulfato o sulfonato preferentemente con iones metálicos alcalinos como cationes. Los jabones utilizables son preferentemente las sales de metal alcalino de ácidos grasos saturados o insaturados con 12 a 18 átomos de C. Dichos ácidos grasos también pueden usarse en forma neutralizada incompleta. Los tensioactivos utilizables del tipo sulfato incluyen las sales de semiésteres de ácido sulfúrico de alcoholes grasos con 12 a 18 átomos de C y los productos de sulfatación de los tensioactivos no iónicos indicados con un bajo grado de etoxilación. Los tensioactivos utilizables del tipo sulfonato incluyen alquilbencenosulfonatos lineales con 9 a 14 átomos de C en el resto alquilo, alcanosulfonatos con 12 a 18 átomos de C, y olefinsulfonatos con 12 a 18 átomos de C, que surgen de la reacción de las monoolefinas correspondientes con trióxido de azufre, y ésteres de ácidos alfa sulfoácidos grasos que surgen de la sulfonación de ésteres metílicos o etílicos de ácido graso.

Dichos tensioactivos están presentes en las composiciones de lavado de acuerdo con la invención en proporciones preferentemente de 5 % p, en particular, de 8 % p a 30 % p, mientras que los desinfectantes de acuerdo con la invención y las composiciones de limpieza de acuerdo con la invención contienen preferentemente de 0,1 % p a 20 % p, en particular de 0,2 % p a 5 p de tensioactivos.

Las composiciones de acuerdo con la invención, en particular si son composiciones previstas para tratar tejidos, pueden contener en particular una o más de las sustancias suavizantes de tejidos catiónicas de las fórmulas generales X, XI, o XII como sustancias activas catiónicas con una acción suavizante de tejidos:





5 en las cuales cada grupo R^1 se selecciona de forma mutuamente independiente de entre grupos alquilo C_{1-6} , grupos alquenoilo o grupos hidroxialquilo; cada grupo R^2 se selecciona de forma mutuamente independiente de entre grupos alquilo C_{8-28} o grupos alquenoilo; $R^3 = R^1$ o $(CH_2)_n-T-R^2$; $R^4 = R^1$ o R^2 o $(CH_2)_n-T-R^2$; $T = -CH_2-$, $-O-CO-$ o $-CO-O-$ y n es un número entero de 0 a 5. Los tensioactivos catiónicos comprenden aniones convencionales de una naturaleza y número necesarios para el equilibrado de la carga, siendo posible seleccionar dichos aniones no solo de, por ejemplo, haluros, sino también de tensioactivos aniónicos. En realizaciones preferidas de la presente invención, los tensioactivos catiónicos que pueden usarse son compuestos de hidroxialquiltrialquilamonio, en particular compuestos de alquil(hidroxi)etil)dimetilamonio C_{12-18} , y, preferentemente, los haluros de los mismos, en particular cloruros. Una composición de acuerdo con la invención contiene preferentemente de 0,5 % p a 25 % p, en particular de 1 % p a 15 % p de tensioactivos catiónicos.

15 Una composición de acuerdo con la invención contiene preferentemente un adyuvante de detergencia orgánico y/o inorgánico, soluble en agua y/o insoluble en agua. Las sustancias adyuvantes de detergencia orgánicas solubles en agua incluyen ácidos policarboxílicos, en particular ácido cítrico y ácidos sacáricos, ácidos aminopolicarboxílicos monoméricos y poliméricos, en particular ácido metilglicindiacético, ácido nutroloiracético y ácido etilendiaminotetraacético junto con ácido poliaspártico, ácidos polifosfónicos, en particular ácido aminotris(metilenfosfónico), ácido etilendiamino-tetraquis(metilenfosfónico) y ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico,
 20 compuestos hidroxilo poliméricos tales como dextrina y ácidos policarboxílicos poliméricos, en particular policarboxilatos obtenibles mediante oxidación de polisacáridos a dextrinas, y/o ácidos acrílicos, ácidos metacrílicos, ácidos maleicos poliméricos y copolímeros de los mismos, los cuales también pueden contener pequeñas proporciones de sustancias polimerizables sin funcionalidad de ácido carboxílico. La masa molecular relativa de los homopolímeros de ácidos carboxílicos insaturados está en general entre 5.000 y 200.000, preferentemente la de los copolímeros entre 2.000 y 200.000, preferentemente de 50.000 a 120.000, en cada caso en relación con el ácido libre. Un copolímero de ácido acrílico/ácido maleico particularmente preferido tiene una masa molecular relativa de 50.000 a 100.000. Son compuestos adecuados, aunque menos preferidos de esta clase los copolímeros de ácido acrílico o ácido metacrílico con viniléteres, tales como vinilmetiléteres, vinilésteres, etileno, propileno y estireno, cuya fracción ácida asciende a al menos un 50 % p. También pueden usarse terpolímeros que contienen como monómeros dos ácidos insaturados y/o las sales de los mismos y como tercer monómero, alcohol vinílico y/o un alcohol vinílico esterificado o un carbohidrato como sustancias adyuvantes de detergencia orgánicas solubles en agua. El primer monómero ácido o la sal del mismo procede de un ácido carboxílico C_3-C_8 monoetilénicamente insaturado y preferentemente de un ácido monocarboxílico C_3-C_4 , en particular de ácido (met)acrílico. El segundo monómero ácido o la sal del mismo puede ser un derivado de un ácido dicarboxílico C_4-C_8 , siendo particularmente preferido el ácido maleico, y/o un derivado de un ácido alquilsulfónico que está sustituido en posición 2 con un resto alquilo o arilo. Dichos polímeros tienen generalmente una masa molecular relativa de entre 1.000 y 200.000. Son copolímeros adicionales preferidos los que comprenden acroleína y ácido acrílico/sales de ácido acrílico o vinil acetato como monómeros. Las sustancias orgánicas adyuvantes de detergencia pueden usarse en particular para producir composiciones líquidas, en forma de soluciones acuosas, preferentemente en forma de soluciones acuosas de 30 a 50 % p. Todos los ácidos indicados se usan generalmente en forma de las sales solubles en agua, en particular las sales de metal alcalino de los mismos.

45 Dichas sustancias orgánicas adyuvantes de detergencia pueden, si se desea, estar presentes en cantidades de hasta un 40 % p, en particular hasta un 25 % p y preferentemente de 1 % p a 8 % p. Las cantidades cercanas al límite superior indicado se usan preferentemente en composiciones pastosas o líquidas, en particular que contienen agua, de acuerdo con la invención.

50 Los materiales inorgánicos adyuvantes de detergencia solubles en agua que pueden considerarse en particular son fosfatos de metal alcalino poliméricos, que pueden estar presentes en forma de las sales de sodio o potasio alcalinas, neutras o ácidas de los mismos. Son ejemplos el difosfato tetrasódico, dihidrogenodifosfato disódico, trifosfato pentasódico, "hexametaposfato sódico" y las correspondientes sales de potasio o mezclas de sales de sodio y potasio. Los materiales inorgánicos adyuvantes de detergencia dispersables en agua, insolubles en agua que se

- usan son en particular aluminosilicatos de metal alcalino cristalinos o amorfos, en cantidades de hasta un 50 % p, preferentemente no más de 40 % p y, en las composiciones líquidas, en particular, de 1 % p a 5 % p. Entre estas, se prefieren composiciones de lavado de aluminosilicatos de sodio de grado cristalino, en particular zeolita A, P y opcionalmente X. Las cantidades cercanas al límite superior indicado se usan preferentemente en composiciones sólidas particuladas. Los aluminosilicatos adecuados en particular no comprenden partículas con un tamaño de grano por encima de 30 μm y consisten preferentemente en una cantidad de al menos un 80 % p de partículas con un tamaño por debajo de 10 μm . Su capacidad de unión al calcio, que puede determinarse tal como se indica en la patente alemana DE 24 12 837, está generalmente en el intervalo de 100 a 200 mg de CaO por gramo.
- Los sustitutos o sustitutos parciales adecuados para los aluminosilicatos indicados son silicatos de metal alcalino cristalinos, que pueden estar presentes solos o mezclados con silicatos amorfos. Los silicatos de metal alcalino utilizables como adyuvantes de detergencia en las composiciones de acuerdo con la invención tienen preferentemente una proporción molar de óxido de metal alcalino con respecto a SiO_2 por debajo de 0,95, en particular de 1:1,1 a 1:12 y pueden estar en forma amorfa o cristalina. Los silicatos de metal alcalino preferidos son silicatos de sodio, en particular silicatos de sodio amorfos, con una proporción molar de $\text{Na}_2\text{O}:\text{SiO}_2$ de 1:2 a 1:2,8. Los silicatos cristalinos usados preferentemente, que pueden estar presentes solos o mezclados con silicatos amorfos, son filosilicatos cristalinos de la fórmula general $\text{Na}_2\text{Si}_x\text{O}_{2x+i} \cdot \text{H}_2\text{O}$, en la cual x, el "módulo", es un número de 1,9 a 4 e y es un número de 0 a 20 y los valores preferidos para x son 2, 3 o 4. Los filosilicatos cristalinos preferidos son aquellos en los cuales x en la fórmula general indicada asume los valores 2 o 3. En particular, se prefieren disilicatos de sodio tanto β - como δ ($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Prácticamente, los silicatos cristalinos anhidros de metal alcalino, producidos a partir de silicatos de metal alcalino amorfos de la fórmula general indicada anteriormente en la que x significa un número de 1,9 a 2,1 también pueden usarse en composiciones de acuerdo con la invención. Un filosilicato cristalino de sodio con un módulo de 2 a 3 tal como puede producirse a partir de arena o sosa se usa en una realización preferida adicionalmente de composiciones de acuerdo con la invención. Los silicatos cristalinos de sodio con un módulo en el intervalo de 1,9 a 3,5 se usan en una realización preferida adicionalmente de composiciones de acuerdo con la invención. En un desarrollo preferido de composiciones de acuerdo con la invención, se usa un compuesto granular de silicato de metal alcalino y carbonato de metal alcalino, como por ejemplo el que está disponible comercialmente con el nombre Nabion® 15. Si un aluminosilicato de metal alcalino, en particular zeolita, está presente como una sustancia adyuvante de detergencia adicional, la proporción de peso de aluminosilicato con respecto a silicato en cada caso en relación con sustancias activas anhidras asciende a de 1:10 a 10:1. En las composiciones que contienen silicatos de metal alcalino tanto amorfos como cristalinos, la proporción de peso de silicato de metal alcalino amorfo con respecto a silicato de metal alcalino cristalino asciende preferentemente a de 1:2 a 2:1 y en particular a de 1:1 a 2:1.
- Las sustancias adyuvantes de detergencia están presentes preferentemente en las composiciones de lavado o limpieza de acuerdo con la invención preferentemente en cantidades de hasta un 60 % p, en particular, de 5 % p a 40 % p.
- En una realización preferida de la invención, una composición de acuerdo con la invención comprende un "bloque adyuvante de detergencia" soluble en agua. El uso de la expresión "bloque adyuvante de detergencia" se prevé para indicar que la composición no contiene ninguna otra sustancia adyuvante de detergencia como tal que sea soluble en agua, es decir, todas las sustancias adyuvantes de detergencia presentes en la composición están combinadas en el "bloque" que se caracteriza de esta manera, haciéndose una excepción, sin embargo, para las cantidades de sustancias que puedan estar presentes, como es convencional en el comercio, en pequeñas cantidades como contaminantes o aditivos estabilizadores en los otros ingredientes de las composiciones. La expresión "soluble en agua" debería tomarse en este caso para significar que, a la concentración que se obtiene en condiciones convencionales mediante la cantidad de entrada de la composición que lo contiene, el bloque adyuvante de detergencia se disuelve sin dejar residuo. Las composiciones de acuerdo con la invención contienen preferentemente al menos un 15 % p y hasta 55 % p, en particular de 25 % p a 50 p de bloque adyuvante de detergencia soluble en agua. El último está compuesto preferentemente de los componentes
- a) de 5 % p a 35 % p de ácido cítrico, citrato de metal alcalino y/o carbonato de metal alcalino, que también puede reemplazarse al menos en parte por hidrogenocarbonato de metal alcalino,
 - b) hasta un 10 % p de silicato de metal alcalino con un módulo en el intervalo de 1,8 a 2,5,
 - c) hasta un 2 % p de ácido fosfónico y/o fosfonato de metal alcalino,
 - d) hasta un 50 % p de fosfato de metal alcalino, y
 - e) hasta un 10 % p de policarboxilato polimérico,
- relacionándose las cantidades indicadas con toda la composición de lavado o limpieza. A menos que se indique explícitamente otra cosa, esto también se aplica a todas las cantidades que se indican más adelante.
- En una realización preferida de composiciones de acuerdo con la invención, el bloque adyuvante de detergencia soluble en agua contiene al menos 2 componentes b), c), d) y e) en cantidades de más de 0 % p.
- Con respecto al componente a), en una realización preferida de composiciones de acuerdo con la invención, están presentes de 15 % p a 25 % p de carbonato de metal alcalino, que puede reemplazarse al menos en parte por

hidrogenocarbonato de metal alcalino, y hasta un 5 % p, en particular de 0,5 % p a 2,5 % p de ácido cítrico y/o citrato de metal alcalino. En una realización alternativa de composiciones de acuerdo con la invención, están presentes como componente a) de 5 % p a 25 % p, en particular de 0,5 % p a 15 % p de ácido cítrico y/o citrato de metal alcalino y hasta un 5 % p, en particular de 1 % p a 5 % p de carbonato de metal alcalino, que puede reemplazarse al menos en parte por hidrogenocarbonato de metal alcalino. Si están presentes tanto carbonato de metal alcalino como hidrogenocarbonato de metal alcalino, el componente a) comprende preferentemente arbonato de metal alcalino e hidrogenocarbonato de metal alcalino en una proporción de peso de 10:1 a 1,1.

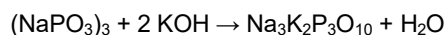
Con respecto al componente b), en una realización preferida de composiciones de acuerdo con la invención, están presentes de 1 % p a 5 % p de silicato de metal alcalino con un módulo en el intervalo de 1,8 a 2,5.

Con respecto al componente c), en una realización preferida de composiciones de acuerdo con la invención, están presentes de 0,05 % p a 1 % p de ácido fosfónico y/o fosfonato de metal alcalino. los ácidos fosfónicos también se toman en este caso para significar ácidos alquilfosfónicos opcionalmente sustituidos, los cuales también pueden comprender dos o más grupos de ácido fosfónico ("ácidos polifosfónicos"). Se seleccionan preferentemente de ácidos hidroxil y/o aminoalquilfosfónicos y/o las sales de metal alcalino de los mismos, tales como por ejemplo ácidodimetilaminometano difosfónico, ácido 3-aminopropil-1-hidroxi-1,1-difosfónico, ácido 1-amino-1-fenilmetanodifosfónico, ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico, ácido aminotris(metilenfosfónico), ácido N,N,N',N'-etilendiamino-tetraquis-(metilenfosfónico) y derivados acilados de ácido fosforoso, los cuales también pueden usarse en cualquier mezcla deseada.

Con respecto al componente d), en una realización preferida de composiciones de acuerdo con la invención, están presentes de 15 % p a 35 % p de fosfato de metal alcalino, en particular polifosfato trisódico. "Fosfato de metal alcalino" es el nombre resumido de las sales de metal alcalino (en particular de sodio y potasio) de los diversos ácidos fosfóricos, siendo posible distinguir entre ácidos metafosfóricos $(\text{HPO}_3)_n$ y ácido ortofosfórico, H_3PO_4 así como representantes de peso molecular mayor. Los fosfatos combinan en este caso una serie de ventajas: actúan como donantes de alcalinidad, evitar los depósitos cal en partes de la máquina o las incrustaciones de cal en las telas y, además, contribuyen al rendimiento de lavado. El dihidrogenofosfato sódico, NaH_2PO_4 , existe como dihidrato (densidad, 1,91 g/cm^3 , punto de fusión, 60 °C) y como monohidrato (densidad, 2,04 g/cm^3). Ambas sales son polvos blancos, muy fácilmente solubles en agua, que pierden su agua o cristalización cuando se calientan y a 200 °C cambian al difosfato de acidez débil (hidrogenodifosfato disódico, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) y a una temperatura mayor a trimetafosfato sódico ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) y a sal de Maddrell. El NaH_2PO_4 presenta una reacción ácida; se obtiene cuando el ácido fosfórico se ajusta con solución de hidróxido sódico a un valor de pH de 4,5 y la suspensión se atomiza. El dihidrogenofosfato potásico (fosfato potásico primario o monobásico, difosfato potásico, KDP), KH_2PO_4 , es una sal blanca con una densidad de 2,33 g/cm^3 , tiene un punto de fusión de 253 °C (descomposición con formación de $(\text{KPO}_3)_x$ polifosfato potásico) y es fácilmente soluble en agua. El hidrogenofosfato disódico (fosfato sódico secundario), Na_2HPO_4 , es una sal cristalina incolora muy fácilmente soluble en agua. Existe en forma anhidra y con 2 moles (densidad, 2,066 g/cm^3 , pérdida de agua a 95 °C), 7 moles (densidad, 1,68 g/cm^3 , punto de fusión, 48 °C con pérdida de 5 H_2O) y 12 moles de agua (densidad, 1,52 g/cm^3 , punto de fusión, 35 °C con pérdida de 5 H_2O), es anhidro a 100 °C y cuando se calienta más, cambia al difosfato $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. El hidrogenofosfato disódico se produce neutralizando el ácido fosfórico con solución de sosa usando fenolftaleína como indicador. El hidrogenofosfato dipotásico (fosfato de potasio secundario o dibásico), K_2HPO_4 , es una sal blanca amorfa, que es fácilmente soluble en agua. El fosfato trisódico, fosfato sódico terciario, Na_3PO_4 , son cristales incoloros, que tienen una densidad como dodecahidrato de 1,62 g/cm^3 y un punto de fusión de 73-76 °C (descomposición), como decahidrato (correspondiente a P_2O_5 al 19-20 %) un punto de fusión de 100 °C y en forma anhidra correspondiente a P_2O_5 al 39-40 %) una densidad de 2,536 g/cm^3 . El fosfato trisódico es fácilmente soluble en agua con una reacción alcalina y se produce mediante evaporación de una solución exactamente de 1 mol de fosfato disódico y 1 mol de NaOH. El fosfato tripotásico (fosfato potásico terciario o tribásico), K_3PO_4 , es un polvo granular deliquescente blanco con una densidad de 2,56 g/cm^3 , tiene un punto de fusión de 1340 °C y es fácilmente soluble en agua con una reacción alcalina. Surge, por ejemplo, cuando la escoria de Thomas se calienta con carbono y sulfato potásico. A pesar de su precio relativamente alto, los fosfatos de potasio más fácilmente solubles y, por tanto, altamente eficaces suelen preferirse en la industria de las composiciones de limpieza sobre los compuestos de sodio correspondientes. El difosfato tetrasódico (pirofosfato sódico), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existe como forma anhidra (densidad, 2,534 g/cm^3 , punto de fusión, 988 °C, también indicado como 880 °C) y como decahidrato (densidad, 1,815-1,836 g/cm^3 , punto de fusión, 94 °C con pérdida de agua). Las sustancias sólidas comprenden cristales incoloros que son solubles en agua con una reacción alcalina. El $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ surge al calentar fosfato disódico a >200 °C o haciendo reaccionar ácido fosfórico con sosa en una proporción estequiométrica y deshidratando la solución mediante atomización. El decahidrato forma complejos con sales de metales pesados y sustancias formadoras de dureza y reduce por tanto la dureza del agua. El difosfato potásico (pirofosfato potásico), $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existe en la forma del trihidrato y es un polvo higroscópico incoloro con una densidad de 2,33 g/cm^3 , que es soluble en agua, ascendiendo el valor del pH de la solución al 1 % a 10,4 a 25 °C. La condensación de NaH_2PO_4 o KH_2PO_4 da lugar a fosfatos de potasio y de sodio de peso molecular mayor, en los cuales es posible distinguir entre representantes cíclicos, los metafosfatos de sodio o potasio, y tipos de cadenas, los polifosfatos de sodio o potasio. Los últimos, en particular, tienen una pluralidad de nombres: fosfatos condensados o térmicos, sal de Graham, sal de Kurrol y sal de Maddrell. Todos los fosfatos de sodio y potasio superiores se designan conjuntamente fosfatos condensados. El trifosfato pentasódico técnicamente importante, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (tripolifosfato sódico), es una sal soluble en agua, blanca, no higroscópica, que es anhidra o cristalizada

con 6 H₂O, de la fórmula general NaO-[P(O)(ONa)-O]_n-Na con n=3. A temperatura ambiente, aproximadamente 17 g, a 60 °C aproximadamente 20 g, a 100 °C alrededor de 32 g de la sal que no contiene agua de cristalización de disuelven en 100 g de agua; tras calentar la solución durante dos horas a 100 °C, se obtienen mediante hidrólisis aproximadamente un 8 % de ortofosfato y 15 % de difosfato. Cuando se produce trifosfato pentasódico, el ácido fosfórico se hace reaccionar con solución de sosa o solución de hidróxido sódico en una proporción estequiométrica y la solución se deshidrata mediante atomización.

Al igual que con la sal de Graham y el difosfato sódico, el trifosfato pentasódico disuelve numerosos compuestos metálicos insolubles (incluso cal, jabones, etc.). El trifosfato pentapotásico, K₅P₃O₁₀ (tripolifosfato potásico), está disponible comercialmente, por ejemplo, en forma de una solución del 50 % p (>23 % de P₂O₅, 25 % de KaO). Los polifosfatos de potasio se utilizan ampliamente en la industria de las composiciones de lavado y limpieza. También existen los tripolifosfatos de potasio, los cuales pueden usarse igualmente para los fines de la presente invención. Estos surgen, por ejemplo, si el trimetafosfato sódico se hidroliza con KOH:



Pueden usarse de acuerdo con la invención exactamente de la misma forma que el tripolifosfato sódico, el tripolifosfato potásico o las mezclas de estos dos; las mezclas de tripolifosfato sódico y tripolifosfato de sodio potasio o las mezclas de tripolifosfato potásico y tripolifosfato de sodio potasio o las mezclas de tripolifosfato sódico y tripolifosfato potásico y tripolifosfato de sodio potasio también pueden usarse de acuerdo con la invención.

Con respecto al componente e), en una realización preferida de composiciones de acuerdo con la invención, están presentes de 1,5 % p a 5 % p de policarboxilatos poliméricos, seleccionados en particular de los productos de polimerización o copolimerización de ácido acrílico ácido metacrílico y/o ácido maleico. Entre estos, se prefieren los homopolímeros de ácido acrílico y, a su vez entre estos, se prefieren particularmente aquellos con una masa molar media en el intervalo de 5.000 D a 15.000 D (patrón de PA).

En otra realización preferida, la composición detergente de acuerdo con la invención comprende una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, p. ej., una lacasa, y/o peroxidasa.

En general, las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deben ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) deben estar presentes en cantidades eficaces.

Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen las mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermofila* y *Fusarium oxysporum* desveladas en los documentos US 4.435.307, US 5.648.263; US 5.691.178; US 5.776.757 y WO 89/09259.

Son celulasas especialmente adecuadas las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado del color. Ejemplos de dichas celulasas son las celulasas que se describen en los documentos EP 0.495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las que se describen en los documentos WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5.457.046, US 5.686.593, US 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

Proteasas: Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen las mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería de proteínas. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferentemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Son ejemplos de proteasas alcalinas las subtilisinas, especialmente las procedentes de *Bacillus*, p. ej., subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en el documento WO 89/06279). Son ejemplos de proteasas de tipo tripsina la tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* que se describen en los documentos WO 89/06270 y WO 94/25583.

Ejemplos de proteasas útiles son las variantes que se describen en los documentos WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, y 274.

Las enzimas proteasas preferidas disponibles comercialmente incluyen Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™, y Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Pura-fect OxP™, FN2™, y FN3™ (Genencor International Inc.).

Lipasas y cutinasas: Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen las mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería de proteínas. Los ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, p. ej., de *T. lanuginosus* (denominado anteriormente *Humicola lanuginosa*) tal como se describe en los documentos EP 258 068 y EP 305 216, cutinasa de *Humicola*, p. ej., *H. insolens* tal como se describe en el documento WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, p. ej., de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (documento EP 218 272), *P. cepacia* (documento EP 331 376), *P. stutzeri* (documento GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (documentos WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (documento WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, p. ej., de *B. subtilis* (Dartois et al., 1993, Biochemica et Biofysica Acta, 1131: 253-360), *B. stearothermophilus* (documento JP 64/744992) o *B. pumilus* (documento WO 91/16422).

Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las que se describen en los documentos WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 00/060063, WO2007/087508 y WO 2009/109500.

Las enzimas lipasas disponibles comercialmente incluyen Lipolase™, Lipolase Ultra™, y Lipex™; Lecitase™, Lipolex™; Lipoclean™, Lipoprime™ (Novozymes A/S). Otras lipasas disponibles comercialmente incluyen Lumafast (Genencor Int Inc); Lipomax (Gist-Brocades/Genencor Int Inc) y lipasa de *Bacillus* sp de Solvay.

Amilasas: Las amilasas (α y/o p) adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen las mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería de proteínas. Las amilasas incluyen por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, p. ej., una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, que se describe con más detalle en el documento GB 1.296.839.

Ejemplos de amilasas útiles son las variantes que se describen en los documentos WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444.

Son amilasas disponibles comercialmente Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (from Genencor International Inc.).

Peroxidasas/oxidadas: Las peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen las mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería de proteínas. Los ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, p. ej., de *C. cinereus*, y variantes del mismo como las que se describen en los documentos WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

La(s) enzima(s) detergentes pueden incluirse en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo detergente, es decir, puede formularse un aditivo separado o un aditivo combinado, por ejemplo, como un granulado, líquido, suspensión, etc. Las formulaciones aditivas detergentes preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones.

Pueden producirse granulados no pulverulentos, p. ej., tal como se desvela en los documentos 4.106.991 y 4.661.452 y puede recubrirse opcionalmente mediant métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de materiales de recubrimiento céreos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 2000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados, en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono y di y triglicéridos de ácidos grasos. Se dan ejemplos de materiales de recubrimiento formadores de película adecuados para su aplicación en técnicas de lecho fluido en el documento GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden estabilizarse, por ejemplo, añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico de acuerdo con métodos establecidos. Pueden prepararse enzimas protegidas de acuerdo con el método que se desvela en el documento EP 238.216.

En otra realización preferida de la invención, la composición contiene de 5 % p a 40 % p, en particular 8-30 % p de tensoactivo aniónico y/o no iónico, hasta 30 % p, en particular 5-40 % p de sustancia adyuvante de detergencia y de 0.2 % p a 2 % p de enzima, seleccionada de proteasas, lipasas, cutinasas, amilasas, pululanases, mananasas, celulasas, oxidadas y peroxidasas y mezclas de las mismas.

Los disolventes orgánicos que pueden usarse en las composiciones de acuerdo con la invención, en particular si éstas están en forma líquida o de pastosa, incluyen alcoholes con 1 a 4 átomos de C, en particular metanol, etanol, isopropanol y terc-butanol, dioles con 2 a 4 átomos de C, en particular etilenglicol y propilenglicol, y mezclas de los mismos y los éteres derivables de las clases de compuestos indicadas. Dichos disolventes miscibles en agua están

presentes preferentemente en las composiciones de lavado de acuerdo con la invención en cantidades de no más de 30 % p, en particular de 6 % p a 20 % p.

Con el fin de establecer un valor de pH deseado que no se obtiene automáticamente mezclando los componentes restantes, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener ácidos que son compatibles con el sistema y son compatibles con el medio ambiente, en particular ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido glutárico y/o ácido adípico, así como ácidos minerales, en particular, ácido sulfúrico, o bases, en particular hidróxidos de amonio o de metal alcalino. Dichos reguladores del pH están presentes en las composiciones de acuerdo con la invención preferentemente en una cantidad de no más de 20 % p, en particular de 1,2 % p a 17 % p.

Los polímeros con una actividad de desprendimiento de manchas, que se conocen a menudo como principios activos "desmanchantes" o, debido a su capacidad para proporcionar un acabado repelente de manchas sobre la superficie tratada, por ejemplo, la fibra, como "repelentes de manchas", son por ejemplo los derivados de la celulosa no iónica o catiónica. Los polímeros con una actividad de desprendimiento de manchas, en particular con respecto a los poliésteres, incluyen copoliésteres preparados a partir de ácidos dicarboxílicos, por ejemplo ácido adípico, ácido ftálico o ácido tereftálico, dioles, por ejemplo etilenglicol o propilenglicol y polioles, por ejemplo polietilenglicol o polipropilenglicol. Los poliésteres con una capacidad de desprendimiento de manchas que se usan preferentemente incluyen aquellos compuestos que, en términos formales, son obtenibles esterificando dos restos de monómeros, siendo el primer monómero un ácido dicarboxílico HOOC-Ph-COOH y el segundo monómero un diol HO-(CHR¹¹-)_aOH, que también puede estar presente como un diol polimérico H-(O-(CHR¹¹-))_abOH. En este caso, Ph significa un resto o- m- o fenileno que puede portar de 1 a 4 sustituyentes seleccionados de restos alquilo de 1 a 22 átomos de C, grupos de ácido sulfónico, grupos carboxilo y mezclas de los mismos, R¹¹ significa hidrógeno, un resto alquilo con 1 a 22 átomos de C y mezclas de los mismos, a significa un número de 2 a 6 y b un número de 1 a 300. Los poliésteres obtenibles de ellos contienen preferentemente no sólo unidades de monómeros de diol -O-(CHR¹¹-)_aO-, sino también unidades de polímero de diol -(O-(CHR¹¹-))_abO-. La proporción molar de unidades de monómero de diol con respecto a unidades de polímero de diol asciende a de 100:1 a 1:100, en particular de 10:1 a 1:10. En las unidades de polímero de diol, el grado de polimerización b está preferentemente en el intervalo de 4 a 200, en particular de 12 a 140. La distribución del peso molecular o el peso molecular promedio o el peso molecular máximo de los poliésteres preferidos con capacidad de desprendimiento de manchas está en el intervalo de 250 a 100.000, en particular de 500 a 50.000. El ácido sobre el que se basa el resto Ph se selecciona preferentemente de ácido tereftálico, ácido isoftálico, ácido ftálico, ácido trimelítico, ácido melítico, los isómeros de ácido sulfoftálico, ácido sulfoisoftálico y ácido sulfotereftálico y mezclas de los mismos. En los que los grupos ácidos de los mismos no forman parte del enlace éster en el polímero, están presentes preferentemente en forma de sal, en particular como una sal de metal alcalino o de amonio. Entre estas, se prefieren particularmente las sales de sodio y potasio. Si se desea, en lugar del monómero HOOC-Ph-COOH, el poliéster con capacidad de desprendimiento de manchas puede contener pequeñas proporciones, en particular no más de 10 % mol en relación con la proporción de Ph con el significado indicado anteriormente, de otros ácidos que comprenden al menos dos grupos carboxilo. Estos incluyen, por ejemplo, ácidos alquilenos y alquilenos dicarboxílicos tales como ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico y ácido sebáico. Los dioles preferidos HO-(CHR¹¹-)_aOH incluyen aquellos en los que R¹¹ es hidrógeno y a es un número de 2 a 6, y aquellos en los que a tiene el valor 2 y R¹¹ se selecciona de restos hidrógeno y alquilo con 1 a 10, en particular 1 a 3 átomos de C. Entre los dioles indicados en último lugar, se prefieren particularmente los de la fórmula HO-CH₂-CHR¹¹-OH, en la que R¹¹ tiene el significado indicado anteriormente. Son ejemplos de componentes diol etilenglicol, 1,2-propilenglicol, 1,3-propilenglicol, 1,4-butanodiol, 1,5-pentanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,8-octanodiol, 1,2-decanodiol, 1,2-dodecanodiol y neopentilglicol. Entre los dioles poliméricos, se prefieren particularmente los polietilenglicoles con una masa molecular promedio en el intervalo de 1000 a 6000. Si se desea, estos poliésteres también pueden terminarse con un grupo terminal, siendo los grupos terminales que pueden considerarse grupos alquilo con 1 a 22 átomos de C y ésteres de ácidos monocarboxílicos: Los grupos terminales unidos por medio de enlaces éster pueden ser a base de ácidos monocarboxílicos alquilo, alqueno y arilo con 5 a 32 átomos de C, en particular 5 a 18 átomos de C. Éstos incluyen ácido valérico, ácido caprónico, ácido enántico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, ácido undecanóico, ácido undecenóico, ácido láurico, ácido lauroleico, ácido tridecanóico, ácido mirístico, ácido miristoléico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido petroselinico, ácido petroselaídico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoláidico, ácido linoléico, ácido eleosteático, ácido araquídico, ácido gadoleico, ácido araquidónico, ácido behénico, ácido erúico, ácido brasídico, ácido clupanodónico, ácido lignocérico, ácido cerótico, ácido melísico, ácido benzoico, que pueden portar de 1 a 5 sustituyentes que tienen un total de hasta 25 átomos de C, en particular 1 a 12 átomos de C, por ejemplo, ácido terc-butilbenzoico. Los grupos terminales también pueden ser a base de ácidos hidroximonocarboxílicos con 5 a 22 átomos de C, que incluyen por ejemplo ácido hidroxivalérico, ácido hidroxicaproico, ácido ricinoleico, el producto de hidrogenación de los mismos, ácido hidroxiesteárico y ácido o- y p-hidroxibenzoico. Los ácidos hidroximonocarboxílicos pueden, a su vez, estar unidos entre sí por medio de su grupo hidroxilo y su grupo carboxilo y estar, por tanto, presentes de forma repetida en un grupo terminal. El número de unidades de ácido hidroximonocarboxílico por grupo terminal, es decir, su grado de oligomerización, está preferentemente en el intervalo de 1 a 50, en particular de 1 a 10. En un desarrollo preferido de la invención, los polímeros de tereftalato de etileno y tereftalato de óxido de polietileno, en los que las unidades de polietilenglicol tienen pesos molares de 750 a 5000 y la proporción molar de tereftalato de etileno con respecto a

tereftalato de óxido de polietileno asciende hasta de 50:50 a 90:10, se usan solos o en combinación con derivados de celulosa.

5 Los inhibidores de la transferencia de color que pueden considerarse para su uso en composiciones de acuerdo con la invención para lavar tejidos incluyen en particular polivinilpirrolidonas, polivinilimidazoles, N-óxidos poliméricos tales como N-óxido de poli(vinilpiridina) y copolímeros de vinilpirrolidona con vinilimidazol y opcionalmente otros monómeros.

10 Las composiciones de acuerdo con la invención para su uso en el lavado de tejidos pueden contener composiciones antiarrugas, ya que las telas de tejidos, en particular las fabricadas con rayón, lana, algodón y mezclas de los mismos, pueden tener tendencia a arrugarse, porque las fibras individuales son sensibles a ser dobladas, retorcidas presionadas y aplastadas transversalmente a la dirección de la fibra. Éstas incluyen, por ejemplo, productos sintéticos a base de ácidos grasos, ésteres de ácido graso, amidas de ácido graso, alquilol ésteres de ácido graso, alquilol amidas o alcoholes grasos de ácido graso, a los cuales se ha hecho reaccionar en general con óxido de etileno, o productos a base de lecitina o ésteres de ácido fosfórico modificados.

15 Los inhibidores de la formación de color gris tienen la misión de capturar la suciedad que se ha disuelto a partir de la superficie dura y en particular de la fibra textil suspendida en el licor. Los coloides solubles en agua de naturaleza principalmente orgánica son adecuados para este fin, por ejemplo almidón, apresto, gelatina, sales o éteres de ácidos carboxílicos o éteres de ácidos sulfónicos de almidón o celulosa o sales de ésteres ácidos de ácido sulfúrico de celulosa o almidón. Las poliamidas hidrosolubles que contienen grupos ácidos también son adecuadas para este fin. Pueden usarse además otros derivados del almidón además de los indicados anteriormente, tales como almidones de aldehído. Se usan preferentemente éteres de celulosa, tales como carboximetilcelulosa (sal sódica), metilcelulosa, hidroxialquilcelulosa y éteres mixtos, tales como metilhidroxietilcelulosa, metilhidroxipropilcelulosa, metilcarboximetilcelulosa y mezclas de los mismos, por ejemplo en cantidades de 0,1 a 5 % p en relación con las composiciones.

20 Las composiciones de lavado pueden contener blanqueantes ópticos, entre estos, en particular, derivados de ácido diaminoestilbenodisulfónico o las sales de metal alcalino de los mismos. Los compuestos adecuados son, por ejemplo, sales de ácido 4,4'-bis(2-anilino-4-morfolino-1,3,5-triazinil-6-amino)estilbeno 2,2'-disulfónico o compuestos de estructura similar que, en lugar del grupo morfolino, portan un grupo etanolamino, un grupo metilamino, un grupo anilino o un grupo 2-metoxietilamino. Además pueden estar presentes blanqueantes del tipo difenilestirilo sustituido, por ejemplo las sales de metal alcalino de 4,4'-bis(2-sulfoestiril)difenilo, 4,4'-bis(4-cloro-3-sulfoestiril)difenilo, or 4-(4-cloroestiril)-4'-(2-sulfoestiril)difenilo. También pueden usarse mezclas de los blanqueantes ópticos indicados anteriormente.

30 Puede ser ventajoso añadir inhibidores de espuma convencionales a la composición, especialmente para su uso en el lavado a máquina. Los inhibidores de espuma adecuados son, por ejemplo, jabones de origen natural o sintético, que comprenden una elevada proporción de ácidos grasos C₁₈-C₂₄. Los inhibidores de espuma no tensioactivos adecuados son, por ejemplo, organopolisiloxanos y mezclas de los mismos con sílice microfino, opcionalmente silanizado, así como parafinas, ceras, ceras microcristalinas y mezclas de las mismas con sílice silanizado o bis-alquilendiamidas de ácido graso. También se usan ventajosamente mezclas de diferentes inhibidores de espuma, por ejemplo, mezclas de siliconas, parafinas o ceras. Los inhibidores de espuma, en particular los inhibidores de espuma que contienen silicona y/o parafina, se unen preferentemente a una sustancia portadora granular que es soluble o dispersable en agua. En este caso, se prefieren particularmente mezclas de parafinas y biesteariletilendiamida.

35 En las composiciones de acuerdo con la invención pueden usarse además principios activos para evitar el deslustrado de los objetos de plata o "inhibidores de la corrosión de la plata". Las composiciones preferidas contra la corrosión de la plata son disulfuros orgánicos, fenoles dihidrídicos, fenoles trihidrídicos, triazoles alquilo o aminoalquilo opcionalmente sustituidos tales como benzotriazol y sales y/o complejos de cobalto, manganeso, titanio, circonio, hafnio, vanadio o cerio. En los que los metales indicados están presentes en uno de los estados de oxidación II, III, IV, V o VI.

40 La variante de proteasa puede asumir la forma de polvo o gránulos, que también pueden recubrirse y/o colorearse opcionalmente y pueden contener materiales portadores convencionales y/o agentes auxiliares de la granulación. En el caso del uso de la forma de gránulos, los gránulos también pueden contener, si se desea, otras sustancias activas.

45 En otra realización preferida de la invención, la composición detergente es un líquido o un sólido, preferentemente un sólido que es un polvo o está en forma granular o es una pastilla. En otra realización preferida, la composición es una composición para lavavajillas, en particular para lavavajillas que está en forma de pastillas.

50 La producción de composiciones sólidas de acuerdo con la invención no es problemática y puede proseguir de una manera conocida en principio, por ejemplo, por deshidratación por pulverización o granulación, con cualquier compuesto peróxi y principio activo reforzador del blanqueamiento que se añada opcionalmente a continuación. Las

composiciones de acuerdo con la invención con una elevada densidad aparente, en particular en el intervalo de 650 g/l a 950 g/l, pueden producirse preferentemente mediante un método que comprende una etapa de extrusión. Las composiciones de lavado o limpieza o los desinfectantes de acuerdo con la invención en forma de soluciones acuosas o soluciones que contienen otros disolventes convencionales se producen de forma particularmente ventajosa simplemente mezclando los ingredientes, que pueden introducirse en un mezclador automático sin disolvente o como una solución.

Métodos y usos

La presente invención también se dirige al uso de una composición detergente tal como se describe en el presente documento en un proceso de limpieza tal como lavandería y/o limpieza de superficies duras. Especialmente, la presente invención se dirige al uso de composiciones detergentes de acuerdo con la invención en lavandería de tejidos y telas, tales como lavado de lavandería doméstica y lavado de lavandería industrial.

Además, la invención también se dirige a uso de composiciones detergentes de acuerdo con la invención en la limpieza de superficies duras tales como lavado de vajillas automatizado (ADW por sus siglas en inglés), lavado de coches y limpieza de superficies industriales.

Las variantes de subtilisina de la presente invención pueden añadirse a y, por tanto, convertirse en un componente de la composición detergente. Por tanto, un aspecto de la invención se relaciona con el uso de una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan de los grupos que consisten en D, E y en la que la variante tiene al menos un 90 % de identidad con las SEQ ID NO: 2 o 4, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones en un proceso de limpieza tal como lavandería y/o limpieza de superficies duras. Otro aspecto se relaciona con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan de los grupos que consisten en D, E, en la que la variante tiene al menos un 90 % de identidad con las SEQ ID NO: 2 o 4 de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad; al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.

Una realización de las invenciones se relaciona con el uso de una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan de los grupos que consisten en D, E y en la que la variante tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad; al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones, en un proceso de limpieza tal como lavandería y/o limpieza de superficies duras, en el que la variante tiene un rendimiento de lavado aumentado en comparación con la subtilisina precursora o en comparación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero no tiene las sustituciones en una o más de dichas posiciones especificadas cuando se analiza en el ejemplo 2, tal como se describe en "Material y métodos".

El proceso de limpieza o el proceso de cuidado de tejidos puede ser, por ejemplo, un proceso de lavandería, un proceso de lavado de vajillas o de limpieza de superficies duras tales como azulejos de baño, suelos, encimeras, desagües, fregaderos y lavabos. Los procesos de lavandería pueden ser, por ejemplo, lavandería doméstica, pero también pueden ser lavandería industrial.

Además, la invención se relaciona con un proceso para lavado de telas y/o prendas en la que el proceso comprende tratar las telas con una solución de lavado que contiene una composición detergente de acuerdo con la invención. El proceso de limpieza o un proceso de cuidado de tejidos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, en un proceso de lavado a máquina o en un proceso de lavado manual. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, una solución de lavado acuosa que contiene una composición detergente.

Los tejidos y/o telas sometidos a un proceso de lavado, limpieza o cuidado de tejidos de la presente invención puede ser lavandería lavable convencional, por ejemplo, lavandería doméstica. Preferentemente, la mayor parte de la lavandería es de prendas y telas, incluyendo prendas de punto, tejidos, tela vaquera, no tejidos, fieltro, hilo, y toallas. Las telas pueden ser a base de celulosa tal como celulósicos naturales, incluyendo algodón, lino, ropa de hogar, yute, ramio, sisal o fibra de coco o celulósicos fabricados por el ser humano (p. ej., originados a partir de pulpa de madera) incluyendo viscosa/rayón, ramio, fibras de acetato de celulosa (trichel), lyocel o mezclas de los mismos. Las telas pueden ser no a base de celulosa tal como poliamidas naturales incluyendo lana, pelo de camello, cachemir, lana de angora, de conejo y seda o polímero sintético tal como nilón, aramida, poliéster, acrílico, polipropileno y expandex/elastano, o mezclas de los mismos, así como mezcla de fibras a base de celulosa y no a base de celulosa. Los ejemplos de mezclas son mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales acompañantes tales

como lana, fibras sintéticas (p. ej., fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro de polivinilo, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida), y fibras que contienen celulosa (p. ej., rayón/viscosa, ramio, lino, ropa de hogar, yute, fibras de acetato de celulosa, lyocel).

5 En los últimos años ha habido un interés creciente en reemplazar componentes en los detergentes, que proviene de productos petroquímicos con componentes biológicos renovables tales como enzimas y polipéptidos sin comprometer el rendimiento de lavado.

10 La invención también tiene que ver con el uso de variantes de proteasa y/o composiciones detergentes de la invención en un proceso de eliminación de manchas proteicas. Las manchas proteicas pueden ser manchas tales como manchas de comida, p. ej., comida de bebé, sebo, cacao, huevo, sangre, leche, tinta, hierba, o una combinación de las mismas.

15 Las composiciones detergentes típicas incluyen diversos componentes además de las enzimas, estos componentes tienen diferentes efectos, algunos componentes como los tensioactivos reducen la tensión superficial en el detergente, lo que permite limpiar la mancha al levantarla, dispersarla y lavarla después, otros componentes como los sistemas de blanqueamiento eliminan la decoloración a menudo mediante oxidación y muchos blanqueantes también tienen fuertes propiedades bactericidas, y se usan para desinfectar y esterilizar. Otros componentes más, como los adyuvantes de detergencia y los quelantes suavizan, p. ej., el agua del lavado eliminando los iones metálicos del líquido.

20 En una realización particular, la invención tiene que ver con el uso de una composición detergente de acuerdo con la invención, es decir, comprende una variante de proteasa tal como se describe anteriormente, en lavandería o lavado de vajillas, en la que dicha composición detergente comprende además al menos uno o más de los siguientes: un tensioactivo, un adyuvante de detergencia, un quelante o agente quelante, un sistema blanqueante y/o componente blanqueante, en particular un tensioactivo, un adyuvante de detergencia, un quelante o agente quelante, sistema blanqueante y/o componente blanqueante tal como se describe anteriormente. En otra realización de dicho uso, la cantidad de un tensioactivo, un adyuvante de detergencia, un quelante o agente quelante, sistema blanqueante y/o componente blanqueante se reducen en comparación con la cantidad de tensioactivo, adyuvante de detergencia, quelante o agente quelante, sistema blanqueante y/o componente blanqueante usados sin la variante de proteasa añadida de la invención Preferentemente, está presente al menos un componente que es un tensioactivo, un adyuvante de detergencia, un quelante o agente quelante, sistema blanqueante y/o componente blanqueante en una cantidad que es un 1 % menos, tal como un 2 % menos, tal como un 3 % menos, tal como un 4 % menos, tal como un 5 % menos, tal como un 6 % menos, tal como un 7 % menos, tal como un 8 % menos, tal como un 9 % menos, tal como un 10 % menos, tal como un 15 % menos, tal como un 20 % menos, tal como un 25 % menos, tal como un 30 % menos, tal como un 35 % menos, tal como un 40 % menos, tal como un 45 % menos, tal como un 50 % menos que la cantidad del componente en el sistema sin la adición de variante de proteasa de la invención, tal como una cantidad convencional de dicho componente. En un aspecto, una variante de proteasa de la invención se usa en composiciones detergentes en las que dicha composición está libre de al menos un componente que es un tensioactivo, un adyuvante de detergencia, un quelante o agente quelante, sistema blanqueante o componente blanqueante y/o polímero.

Método de lavado

45 Las composiciones detergentes de la presente invención son idealmente adecuadas para su uso en aplicaciones de lavandería. Por consiguiente, la presente invención incluye un método para lavar una tela. El método comprende las etapas de poner en contacto una tela que se va a lavar con una solución de limpieza de lavandería que comprende la composición detergente de acuerdo con la invención. La tela puede comprender cualquier tela capaz de lavarse en condiciones normales de uso del consumidor. La solución tiene preferentemente un pH de alrededor de 5,5 a alrededor de 11,5. Las composiciones pueden emplearse a concentraciones de alrededor de 100 ppm, preferentemente 500 ppm a alrededor de 15.000 ppm en la solución. Las temperaturas del agua oscilan típicamente de alrededor de 5 °C hasta alrededor de 95 °C, incluyendo alrededor de 10 °C, alrededor de 15 °C, alrededor de 20 °C, alrededor de 25 °C, alrededor de 30 °C, alrededor de 35 °C, alrededor de 40 °C, alrededor de 45 °C, alrededor de 50 °C, alrededor de 55 °C, alrededor de 60 °C, alrededor de 65 °C, alrededor de 70 °C, alrededor de 75 °C, alrededor de 80 °C, alrededor de 85 °C y alrededor de 90 °C. La proporción de agua con respecto a la tela es típicamente de alrededor de 1:1 hasta alrededor de 30:1.

60 En realizaciones particulares, el método de lavado se lleva a cabo a un pH de alrededor de 5,0 hasta alrededor de 11,5, o de alrededor de 6 a alrededor de 10,5, de alrededor de 5 a alrededor de 11, de alrededor de 5 a alrededor de 10, de alrededor de 5 a alrededor de 9, de alrededor de 5 a alrededor de 8, de alrededor de 5 a alrededor de 7, de alrededor de 5,5 a alrededor de 11, de alrededor de 5,5 a alrededor de 10, de alrededor de 5,5 a alrededor de 9, de alrededor de 5,5 a alrededor de 8, de alrededor de 5,5 a alrededor de 7, de alrededor de 6 a alrededor de 11, de alrededor de 6 a alrededor de 10, de alrededor de 6 a alrededor de 9, de alrededor de 6 a alrededor de 8, de alrededor de 6 a alrededor de 7, de alrededor de 6,5 a alrededor de 11, de alrededor de 6,5 a alrededor de 10, de alrededor de 6,5 a alrededor de 9, de alrededor de 6,5 a alrededor de 8, de alrededor de 6,5 a alrededor de 7, de alrededor de 7 a alrededor de 11, de alrededor de 7 a alrededor de 10, de alrededor de 7 a alrededor de 9, o alrededor de 7 a alrededor de 8, alrededor de 8 a alrededor de 11, alrededor de 8 a alrededor de 10, alrededor de 8

a alrededor de 9, alrededor de 9 a alrededor de 11, alrededor de 9 a alrededor de 10, alrededor de 10 a alrededor de 11, preferentemente de alrededor de 5,5 a alrededor de 11,5,

5 En realizaciones particulares, el método de lavado se lleva a cabo a una dureza del agua de alrededor de 0° dH a alrededor de 30° dH, tal como alrededor de 1° dH, alrededor de 2° dH, alrededor de 3° dH, alrededor de 4° dH, alrededor de 5° dH, alrededor de 6° dH, alrededor de 7° dH, alrededor de 8° dH, alrededor de 9° dH, alrededor de 10° dH, alrededor de 11° dH, alrededor de 12° dH, alrededor de 13° dH, alrededor de 14° dH, alrededor de 15° dH, alrededor de 16° dH, alrededor de 17° dH, alrededor de 18° dH, alrededor de 19° dH, alrededor de 20° dH, alrededor de 21° dH, alrededor de 22° dH, alrededor de 23° dH, alrededor de 24° dH, alrededor de 25° dH, alrededor de 26°
10 dH, alrededor de 27° dH, alrededor de 28° dH, alrededor de 29° dH, alrededor de 30° dH. En condiciones de lavado europeas típicas, el grado de dureza es de alrededor de 16 °dH, en condiciones de lavado de EE.UU. típicas, y condiciones de lavado asiáticas típicas, de alrededor de 3 °dH.

15 La presente invención se relaciona con un método para limpiar un tejido, una vajilla o superficie dura con una composición detergente que comprende una variante de proteasa de la invención.

Una realización preferida tiene que ver con un método de limpieza, comprendiendo dicho método las etapas de: poner en contacto un objeto con una composición de limpieza que comprende una variante de proteasa de la invención en condiciones adecuadas para limpiar dicho objeto. En una realización preferida la composición de
20 limpieza es una composición detergente y el proceso es un proceso de lavandería o lavado de vajillas.

Otra realización más se relaciona con un método para eliminar manchas de la tela que comprende poner en contacto dicha tela con una composición que comprende una proteasa de la invención en condiciones adecuadas para limpiar dicho objeto.
25

En una realización preferida las composiciones para su uso en los métodos anteriores comprenden además al menos una enzima adicional tal como se describe anteriormente, enzima que se selecciona del grupo de las hidrolasas tales como proteasas, lipasas, cutinasas, carbohidrasas tales como amilasas celulasas, hemicelulasas xilanasas, y pectinasa o una combinación de las mismas En otra realización preferida más las composiciones para su uso en los métodos anteriores comprenden una cantidad reducida de al menos uno o más de los siguientes componentes: un tensioactivo, un adyuvante de detergencia, un quelante o agente quelante, sistema blanqueante o componente blanqueante o un polímero.
30

También se contemplan composiciones y métodos de tratamiento de telas (p. ej., para eliminar el apresto de un tejido) usando una o más de las proteasas de la invención. La proteasa puede usarse en cualquier método de tratamiento de telas lo cual es bien conocido en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.077.316). Por ejemplo, en un aspecto, la sensación y apariencia de una tela se mejora mediante un método que comprende poner en contacto la tela con una variante de proteasa de la invención en una solución. En un aspecto, la tela se trata con la solución a presión.
35

En una realización, la variante de proteasa se aplica durante o después de tejer los tejidos, o durante la etapa de retirada del apresto, o de una o más etapas adicionales de procesamiento de las telas. Durante el tejido de las telas, los hilos se exponen a una tensión mecánica considerable. Antes de tejer en los telares mecánicos, las tramas de los hilos suelen recubrirse con almidón o derivados de almidón de apresto con el fin de incrementar su fuerza tensil y evitar la rotura. La variante de proteasa puede aplicarse para eliminar estas proteínas o derivados de proteínas de apresto. Después de tejer los tejidos, la tela puede proseguir a la etapa de retirada del apresto. Ésta puede ir seguida por una o más etapas adicionales de procesamiento de la tela. La retirada del apresto es la acción de eliminar el apresto de las telas. Después de tejer, debe eliminarse el recubrimiento de apresto antes de procesar adicionalmente la tela con el fin de garantizar un resultado homogéneo y resistente al lavado. También se proporciona un método para retirar el apresto que comprende la hidrólisis enzimática del apresto mediante la acción de una enzima.
40
45
50

Todas las cuestiones, materias objeto y realizaciones que se desvelan para composiciones detergentes en esta solicitud también son aplicables a los métodos y usos que se describen en el presente documento. Por lo tanto, se hace referencia explícitamente a dicha divulgación para los métodos y usos que se describen también en el presente documento.
55

Ejemplos

60 Materiales y métodos

Métodos generales de biología molecular:

65 A menos que se mencione otra cosa, las manipulaciones de ADN y transformaciones se realizaron usando métodos habituales de biología molecular (Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1995); Harwood y Cutting (1990).

Ensayos de proteasa:

1) Ensayo de Suc-AAPF-pNA:

Sustrato de pNA Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)
 Temperatura: Temperatura ambiente (25 °C)
 Tampones de ensayo: Ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, Triton X-100 0,01 % ajustado a valores de pH de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, y 11,0 con HCl o NaOH.

5 Se mezclaron 20 µl de proteasa (diluida en Triton X-100 0,01 %) con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato de pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluido posteriormente a 54 x con Triton X-100 0,01 %). El aumento de la DO₄₀₅ se verificó como una medida de la actividad de la proteasa.

10 2) Ensayo de protazyme AK:

Sustrato: Comprimido de Protazyme AK (caseína reticulada y coloreada; de Megazyme)
 Temperatura: 37 °C (o ajustada a otra temperatura de ensayo).
 Tampón de ensayo: Ácido succínico 100mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, Triton X-100 0,01 % pH 6,5 o pH 7,0.

15 Se suspendió un comprimido de Protazyme AK en 2,0 ml de Triton X-100 0,01 % mediante agitación suave. Se dispensaron 500 µl de esta suspensión y 500 µl de tampón de ensayo en un tubo de microcentrifuga y se colocaron en hilo. Se añadieron 20 µl de solución de proteasa (diluida en Triton X-100 0,01 %) a la mezcla enfriada en hielo. El ensayo se inició transfiriendo el tubo a un mezclador térmico a 37 °C y agitando a su velocidad máxima (1400 rpm). Tras 15 minutos, el tubo volvió a ponerse en el baño de hielo. Para eliminar el sustrato no reaccionado, la mezcla se centrifugó en una centrifuga enfriada en hielo durante unos cuantos minutos y se transfirieron 200 µl de sobrenadante a una placa de microtitulación. La absorbancia del sobrenadante se midió a 650 nm. Se ensayó en paralelo una muestra con 20 µl de Triton X-100 0,01 % en lugar de solución de proteasa, y su valor se sustrajo de la medida de la muestra de proteasa.

Ensayo de estrés mecánico automático (AMSA, por sus siglas en inglés) para lavandería

25 Con el fin de evaluar el rendimiento de lavado en el lavado de lavandería se realizan experimentos usando el ensayo de estrés mecánico automático (AMSA). Con el AMSA, puede examinarse una gran cantidad de soluciones detergentes enzimáticas en volúmenes pequeños. La placa de AMSA tiene una serie de ranuras para las soluciones de prueba y una tapa que comprime firmemente la muestra de lavandería, el tejido que se va a lavar, contra las aberturas de la ranura. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, los tejidos y la tapa se agitan vigorosamente para poner la solución de prueba en contacto con el tejido y aplicar estrés mecánico de una manera oscilante periódica regular. Para descripción adicional, véase el documento WO02/42740 especialmente en el párrafo "Special method embodiments" de las páginas 23-24.

35 Los experimentos de lavandería se llevan a cabo en las condiciones experimentales que se especifican a continuación:

Dosis de detergente	5 g/l (detergente líquido) 2,5 g/l (detergente en polvo)
Volumen de solución de prueba	160 microlitros
pH	Tal cual
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	30 °C
Dureza del agua	15 °dH

Los detergentes modelo y materiales de análisis fueron de la siguiente forma:

Detergente modelo líquido de lavandería	Alquiletoxi sulfato sódico (C-9-15, 2EO) 6,0 % Dodecil benzenosulfonato sódico 3,0 % Toluenosulfonato sódico 3,0 % Ácido ólico 2,0 % Etoxilato de alcohol primario (C12-15, 7EO) 3,0 %
---	--

	<p>Etoxilato de alcohol primario (C12-15, 3EO) 2,5 % Etanol 0,5 % Monopropilenglicol 2,0 % Citrato trisódico 2H2O 4,0 % Trietanolamina 0,4 % agua desionizada ad 100 % pH ajustado a 8,5 con NaOH</p>
Detergente modelo en polvo de lavandería	<p>Citrato sódico dihidrato 32,3 % LAS sódico 24,2 % Laurilsulfato sódico 32,2 % Neodol 25-7 (etoxilato de alcohol) 6,4 % Sulfato sódico 4,9 %</p>
Material de análisis	<p>PC-S-37 (huevo entero sobre algodón/poliéster) PC-S-39 (huevo entero envejecido sobre algodón/poliéster)</p>

La dureza del agua se ajustó a 15°dH mediante la adición de CaCl₂, MgCl₂, y NaHCO₃ (Ca²⁺:Mg²⁺ = 4:1:7.5) al sistema de análisis. Tras el lavado, los tejidos se aclararon con agua corriente y se secaron.

- 5 El rendimiento de lavado se mide como la luminosidad del color del tejido lavado. La luminosidad también puede expresarse como la intensidad de la luz reflejada desde la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra está manchada, la intensidad de la luz reflejada es menor que la de una muestra limpia. Por tanto, la intensidad de la luz reflejada puede usarse para medir el rendimiento de lavado.
- 10 Se realizan mediciones de color con un escáner de cama plana (Kodak iQsmart, Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Dinamarca), que se usa para capturar una imagen del tejido lavado.

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

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

20 Ejemplo 1: Preparación y análisis de variantes de proteasa

Preparación y expresión de variantes

Mutación e introducción de un casete de expresión en *Bacillus subtilis*.

25 Todas las manipulaciones de ADN se efectuaron mediante PCR (p. ej., Sambrook et al.; Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory Press) y todos los expertos en la técnica pueden repetirlas. Se usaron construcciones recombinantes de *B. subtilis* que codifican variantes de proteasa para inocular los matraces de agitación que contenían un medio rico (p. ej., PS-1: 100 g/l sacarosa (Danisco n.º de cat. 109-0429), 40 g/l corteza de soja (harina de soja), 10g/l Na₂HPO₄.12H₂O (Merck n.º de cat. 6579), 0,1ml/l Pluronic PE 6100 (BASF 102-3098)). El cultivo tarda típicamente 4 días a 30 °C en agitación con 220 rpm.

Fermentación de variantes

35 La fermentación puede realizarse mediante métodos bien conocidos en la técnica o de la forma siguiente. Se sembró en estrías una cepa de *B. subtilis* que portaba el plásmido de expresión pertinente en una placa de agar LB con un antibiótico pertinente (6 µg /ml cloranfenicol), y se cultivó durante toda la noche a 37 °C.

Las colonias se transfirieron a 100 ml de medio PS-1 complementado con el antibiótico pertinente en un matraz de agitación de 500 ml.

40 Las células y otro material no disuelto se eliminaron del caldo de fermentación mediante centrifugación a 4500 rpm durante 20-25 minutos. Después, el sobrenadante se filtró para obtener una solución transparente.

45 Ejemplo 2: Análisis de variantes de subtilisina

Los rendimientos de lavado de las variantes de proteasa en relación con BPN' (SEQ ID NO: 2) con la mutación Y217L se analizaron en un detergente modelo en polvo y líquido a una temperatura de 30 °C usando el método AMSA tal como se describe en "Material y métodos".

50

Resultados:

5 Los rendimientos de lavado de las variantes de proteasa y de su proteasa precursora correspondiente (SEQ ID NO: 2) con la Y217L para las dos manchas PC-S-37 (huevo entero sobre algodón/poliéster) y PC-S-39 (huevo entero envejecido sobre algodón/poliéster) se muestran en la tabla 2.1 más adelante.

Tabla 2.1. Datos de AMSA

Mancha	PC-S-37		PC-S-39
	Det 5	PDET 2	PDET 2
Y217L	100 %	100 %	100 %
Y217E	109 %	283 %	133 %
Y217D	438 %	700 %	267 %
Y217R	120 %	436 %	144 %
N218E	648 %	200 %	630 %
N218D	335 %	432 %	170 %
N218S	631 %	-	830 %
N218T	352 %	308 %	520 %
Y217E N218D	949 %	693 %	1348 %
Y217E N218E	792 %	731 %	1754 %
Y217K N218K	582 %	1001 %	160 %
Y217R N218R	698 %	634 %	200 %
Y217R N218K	569 %	912 %	144 %
Y217K N218R	655 %	859 %	-
Y217E N218S	448 %	660 %	827 %
Y217E N218T	137 %	511 %	-
Y217D N218S	796 %	732 %	2069 %
Y217D N218R	10 %	318 %	213 %
Y217E N218K	2 %	148 %	8 %

10 Los resultados muestran que una carga negativa en la posición 217 o 218, que puede proporcionarse por el resto D o E aumenta el rendimiento en comparación con una variante sin carga en una de estas posiciones, es decir, Y217L.

15 El efecto de una carga negativa en la posición 217 o 218 puede aumentarse adicionalmente ofreciendo una segunda carga negativa, que podría ser, bien el mismo aminoácido o bien otro aminoácido cargado, es decir, bien D o bien E como ejemplo Y217E+N218D e Y217E+N218E en comparación con las variantes correspondientes con la mutación individual Y217E, N218D y N218E en el mismo detergente.

Las variantes con dos cargas negativas en las posiciones 217 y 218 fueron mejores que las variantes que combinaron una carga negativa con una positiva (Y217D+N218R, Y217E+N218K).

20 A partir de estos resultados, es evidente que las composiciones detergentes de acuerdo con la invención, es decir, que comprenden variantes tal como se describe, son ventajosas.

25 La invención que se describe y se reivindica en el presente documento no debe limitarse en su alcance por los aspectos específicos que se desvelan en el presente documento, ya que estos aspectos están previstos como ilustraciones de varios aspectos de la invención. Cualquier aspecto equivalente está previsto que esté dentro del alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las que se muestran y se describen en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente. También se pretende que dichas modificaciones queden comprendidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. En caso de conflicto, regirá la presente divulgación, incluyendo las definiciones.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Henkel AG & Co. KGaA
- 5 <120> Composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilasa
- <130> PT031293
- <160>4
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1149
- 15 <212> ADN
- <213> *Bacillus amyloliquefaciens*
- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (1).(1146)
- <220>
- <221> sig_peptide
- <222> (1)..(90)
- 25 <220>
- <221> mat_peptide
- <222> (322)..(1146)
- 30 <400> 1

```

atg aga ggc aaa aaa gta tgg atc agt ttg ctg ttt gct tta gcg tta 48
Met Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu
-105 -100 -95

atc ttt acg atg gcg ttc ggc agc aca tcc tct gcc cag gcg gca ggg 96
Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala Ala Gly
-90 -85 -80

aaa tca aac ggg gaa aag aaa tat att gtc ggg ttt aaa cag aca atg 144
Lys Ser Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met
-75 -70 -65

agc acg atg agc gcc gct aag aag aaa gat gtc att tct gaa aaa gcc 192
Ser Thr Met Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly
-55 -50 -45

ggg aaa gtg caa aag caa ttc aaa tat gta gac gca gct tca gct aca 240
Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala Ala Ser Ala Thr
-40 -35 -30

tta aac gaa aaa gct gta aaa gaa ttg aaa aaa gac ccg agc gtc gct 288
Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala
-25 -20 -15

tac gtt gaa gaa gat cac gta gca cat gcg tac gcg cag tcc gtg cct 336
Tyr Val Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro
-10 -5 -1 1 5

tac ggc gta tca caa att aaa gcc cct gct ctg cac tct caa ggc tac 384
Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr
10 15 20

act gga tca aat gtt aaa gta gcg gtt atc gac agc ggt atc gat tct 432
Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser

```

ES 2 582 608 T3

25				30				35								
tct	cat	cct	gat	tta	aag	gta	gca	ggc	gga	gcc	agc	atg	gtt	cct	tct	480
Ser	His	Pro	Asp	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Pro	Ser	
		40				45					50					
gaa	aca	aat	cct	ttc	caa	gac	aac	aac	tct	cac	gga	act	cac	gtt	gcc	528
Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	
	55				60						65					
ggc	aca	ggt	gcg	gct	ctt	aat	aac	tca	atc	ggt	gta	tta	ggc	ggt	gcg	576
Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala	
70					75					80					85	
cca	agc	gca	tca	ctt	tac	gct	gta	aaa	ggt	ctc	ggt	gct	gac	ggg	tcc	624
Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	
				90					95					100		
ggc	caa	tac	agc	tgg	atc	att	aac	gga	atc	gag	tgg	gcg	atc	gca	aac	672
Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Asn	Gly	Ile	Glu	Trp	Ala	Ile	Ala	Asn	
			105					110						115		
aat	atg	gac	ggt	att	aac	atg	agc	ctc	ggc	gga	cct	tct	ggg	tct	gct	720
Asn	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	
		120					125						130			
gct	tta	aaa	gcg	gca	ggt	gat	aaa	gcc	ggt	gca	tcc	ggc	gtc	gta	gtc	768
Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Val	Val	
	135					140					145					
ggt	gcg	gca	gcc	ggg	aac	gaa	ggc	act	tcc	ggc	agc	tca	agc	aca	gtg	816
Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	
150					155					160					165	
ggc	tac	cct	ggt	aaa	tac	cct	tct	gtc	att	gca	gta	ggc	gct	ggt	gac	864
Gly	Tyr	Pro	Gly	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Asp	
				170					175						180	
agc	agc	aac	caa	aga	gca	tct	ttc	tca	agc	gta	gga	cct	gag	ctt	gat	912
Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	Pro	Glu	Leu	Asp	
			185					190						195		
gtc	atg	gca	cct	ggc	gta	tct	atc	caa	agc	acg	ctt	cct	gga	aac	aaa	960
Val	Met	Ala	Pro	Gly	Val	Ser	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	
		200					205						210			
tac	ggg	gcg	tac	aac	ggg	acg	tca	atg	gca	tct	ccg	cac	ggt	gcc	gga	1008
Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	His	Val	Ala	Gly	
	215					220						225				
gcg	gct	get	ttg	att	ctt	tot	aag	cac	ccg	aac	tgg	aca	aac	act	caa	1056
Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn	Trp	Thr	Asn	Thr	Gln	
230					235					240					245	
gtc	cgc	agc	agt	tta	gaa	aac	acc	act	aca	aaa	ctt	ggg	gat	tct	ttc	1104
Val	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Thr	Thr	Thr	Lys	Leu	Gly	Asp	Ser	Phe	
				250					255						260	
tac	tat	gga	aaa	ggg	ctg	atc	aac	gta	cag	gcg	gca	gct	cag	taa		1149
Tyr	Tyr	Gly	Lys	Gly	Leu	Ile	Asn	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Gln			
			265					270						275		

<210> 2
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400>2

Met Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu
 -105 -100 -95

Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala Ala Gly
 -90 -85 -80

Lys Ser Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met
 -75 -70 -65 -60

Ser Thr Met Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly
 -55 -50 -45

Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala Ala Ser Ala Thr
 -40 -35 -30

Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala
 -25 -20 -15

Tyr Val Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro
 -10 -5 -1 1 5

Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr
 10 15 20

Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser
 25 30 35

Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser
 40 45 50

Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala
 55 60 65

Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala
 70 75 80 85

Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser
 90 95 100

Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn
 105 110 115

Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala
 120 125 130

ES 2 582 608 T3

Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala Ser Gly Val Val Val
 135 140 145

Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val
 150 155 160 165

Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp
 170 175 180

Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro Glu Leu Asp
 185 190 195

Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys
 200 205 210

Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly
 215 220 225

Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr Gln
 230 235 240 245

Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe
 250 255 260

Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln
 265 270 275

5 <210> 3
 <211> 1143
 <212> ADN
 <213> *Bacillus lentus*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1140)

15 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1) .. (81)

20 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (334)..(1140)

<400> 3

ES 2 582 608 T3

atg aag	aaa ccg ttg ggg aaa	att gtc gca agc acc	gca cta ctc	45
Met Lys	Lys Pro Leu Gly Lys	Ile Val Ala Ser Thr	Ala Leu Leu	
-110	-105	-100		
att tct gtt gct ttt agt tca tcg atc gca tcg gct gct gaa gaa gca	93			
Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala				
-95	-90	-85		
aaa gaa aaa tat tta att ggc ttt aat gag cag gaa gct gtc agt gag	141			
Lys Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu				

ES 2 582 608 T3

-80	-75	-70	-65	
ttt gta gaa caa gta gag gca aat gac gag gtc gcc att ctc tct gag Phe Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu				189
	-60	-55	-50	
gaa gag gaa gtc gaa att gaa ttg ctt cat gaa ttt gaa acg att cct Glu Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro				237
	-45	-40	-35	
gtt tta tcc gtt gag tta agc cca gaa gat gtg gac gcg ctt gaa ctc Val Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu				285
	-30	-25	-20	
gat cca gcg att tct tat att gaa gag gat gca gaa gta acg aca atg Asp Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met				333
	-15	-10	-5	-1
gcg caa tcg gta cca tgg gga att agc cgt gtg caa gcc cca gct gcc Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala				381
1	5	10	15	
cat aac cgt gga ttg aca ggt tct ggt gta aaa gtt gct gtc ctc gat His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp				429
	20	25	30	
aca ggg ata tcc act cat cca gat cta aat att cgt ggt ggc gca agc Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser				477
	35	40	45	
ttt gta cca ggg gaa ccg tcg act caa gat ggg aat ggg cat ggc acg Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr				525
	50	55	60	
cat gtg gcc ggg acg atc gct gct tta aac aat tcg att ggc gtt ctt His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu				573
	65	70	75	80
ggc gta gct cct agc gct gag cta tac gct gtt aaa gtc cta ggg gcg Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala				621
	85	90	95	
agc ggt tca ggt tcg gtc agc tcg att gcc caa gga ttg gaa tgg gca Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala				669
	100	105	110	
ggg aac aat ggc atg cac gtt gct aat ttg agt tta gga agc cct tcg Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser				717
	115	120	125	
cca agt gcc aca ctc gag caa gct gtt aat agc gcg act tct aga ggc Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly				765
	130	135	140	
gtt ctt gtt gta gcg gca tct ggg aat tca ggt gca ggc tca atc agc Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser				813
	145	150	155	160
tat ccg gcg cgc tat gcg aac gca atg gca gtc gga gct act gat caa Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln				861
	165	170	175	
aac aac aac cgc gct agc ttt tca cag tat ggc gca ggc ctt gac att Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile				909
	180	185	190	

ES 2 582 608 T3

```

gtc gca ccc ggg gta aac gtg cag agc aca tac cca ggt tca aca tat      957
Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
      195                                200                                205

gcc agc tta aac ggt aca tcg atg gct act cct cat gtt gca ggt gcg      1005
Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
      210                                215                                220

gcc gcc ctt gtt aaa caa aag aac cca tct tgg tct aat gta caa att      1053
Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
      225                                230                                235                                240

cga aat cat cta aag aat acg gca act agt tta gga agc acg aac ttg      1101
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
      245                                250                                255

tat gga agc gga ctt gtt aac gca gaa gcg gca acg cgt taa      1143
Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
      260                                265

```

<210> 4
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> *Bacillus lentus*
 <400> 4

5

```

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
      -110                                -105                                -100

Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala
      -95                                -90                                -85

Lys Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu
      -80                                -75                                -70                                -65

Phe Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu
      -60                                -55                                -50

Glu Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro
      -45                                -40                                -35

Val Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu
      -30                                -25                                -20

Asp Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met
      -15                                -10                                -5                                -1

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
      1                                5                                10                                15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
      20                                25                                30

```

10

ES 2 582 608 T3

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
 115 120 125
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
 130 135 140
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
 180 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
 195 200 205
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 210 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
 245 250 255
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición detergente que comprende una variante de subtilisina que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, pero menos de un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4 y que comprende además las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D y E, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.
- 10 2. La composición detergente de acuerdo con la reivindicación 1 en la que X y Z en la variante son el mismo aminoácido.
- 15 3. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la variante tiene un rendimiento de lavado mejorado sobre manchas de huevo en comparación con el precursor o en comparación con una proteasa con la SEQ ID NO: 2.
- 20 4. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición es un líquido o un sólido, preferentemente un sólido que es un polvo o está en forma granular o es una pastilla.
- 25 5. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición es una composición detergente de lavandería o una composición de lavado de vajillas, preferentemente una composición de lavado de vajillas a máquina.
- 30 6. El uso de una composición detergente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en un proceso de limpieza.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el proceso de limpieza es lavandería.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el proceso de limpieza es limpieza de superficies duras tal como lavado de vajillas.
- 35 9. El uso de una composición detergente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la eliminación de manchas de huevo.
- 40 10. Un método para producir una composición detergente que comprende la etapa de añadir una variante de subtilisina que se ha obtenido mediante un método que comprende introducir en una subtilisina precursora que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4 que corresponde a Y217X y N218Z de SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en D y E, y en la que el número de alteraciones en la variante de subtilisina es 1-20, p. ej., 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en la que la subtilisina precursora se selecciona del grupo que consiste en:
- a. un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID NO: 2 o 4;
- b. un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID NO: 1 o 3, o la secuencia de ADNc del mismo.