

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 964**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/28** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

**C12N 9/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12174500 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2540825**

54 Título: **Composiciones limpiadoras que comprenden variantes de amilasa con referencia a un listado de frecuencias**

30 Prioridad:

**30.06.2011 EP 11172288**

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

**17.04.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JACKSON, MICHELLE;  
ANDERSEN, CARSTEN;  
BEIER, LARS;  
FRIIS, ESBEN PETER;  
TOSCANO, MIGUEL DUARTE GUILHERME  
PEREIRA;  
BJOERNVAD, MADS;  
RASMUSSEN, FRANK WINTHER;  
CHRISTIANSEN, LIV SPAANGNER;  
SOUTER, PHILIP FRANK;  
BEWICK, LINDSAY SUZANNE;  
KAASGAARD, SVEND;  
OEBRO, JENS;  
LARSEN, SIGNE ESKILDSEN;  
SVENDSEN, ALLAN;  
JOHANSEN, ANNETTE HELLE y  
SKJOET, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 608 964 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones limpiadoras que comprenden variantes de amilasa con referencia a un listado de frecuencias

5 Esta solicitud contiene un listado de secuencias en un soporte de lectura informática.

**Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

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

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

25 Los métodos para aumentar la termoestabilidad de las alfa-amilasas se han estudiado bien. Suzuki y col. (1989) describen alfa-amilasas quiméricas, en las que regiones específicas de una alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* se han sustituido por las correspondientes regiones de una alfa-amilasa de *B. licheniformis*. Las alfa-amilasas quiméricas se construyeron con el fin de identificar regiones responsables de la termoestabilidad. Se descubrió que dichas regiones incluían los restos de aminoácidos 177-186 y los restos de aminoácidos 255-270 de la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens*. Igarashi y col. 1998 muestran que la termoestabilidad de las amilasas de tipo AmyS se puede  
30 aumentar mediante la delección de dos restos de aminoácidos, R179-G180, (numeración AmyS ) de un bucle (F 178 a A184). Sin embargo, Shiau y col. (2003) mostraron que la enzima AmyS con delección en el mismo bucle tiene una actividad específica menor para la hidrólisis del almidón de maíz a alta temperatura que su enzima progenitora, negando una de las principales ventajas de las amilasas AmyS. Por motivos ambientales, es cada vez más importante disminuir las temperaturas de lavado de ropa, lavado de vajillas y/o en otros procesos de limpieza. Sin embargo, la mayoría de las enzimas incluidas las amilasas tienen una temperatura óptima que está por encima de la temperatura habitualmente utilizada en el lavado a baja temperatura. La alfa-amilasa es una enzima fundamental a utilizar en composiciones detergentes, y su uso se ha vuelto cada vez más importante para la eliminación de manchas de almidón durante el lavado de ropa o el lavado de vajillas. Por tanto, es importante descubrir variantes de alfa-amilasas que retengan su capacidad limpiadora, efecto de eliminación de manchas y/o su actividad cuando se disminuye la  
35 temperatura. WO 01/66712 y US-6093562 se refieren a variantes de alfa-amilasa que presentan una alteración en al menos una de numerosas propiedades, incluidas la estabilidad térmica mejorada, y en WO 99/23211 se muestra una actividad aumentada a temperaturas de 10 a 60 °C. US-2003/171236 describe variantes que tienen propiedades mejoradas, especialmente en la licuefacción del almidón y en procesos de sacarificación. WO 98/05748 describe composiciones detergentes que comprenden enzimas amilasas para reforzar la eliminación de manchas oscuras y de suciedad. US-6623948 se refiere a variantes de amilasa con rendimiento mejorado en condiciones alcalinas.

40 Sin embargo, a pesar de la eficacia de las actuales composiciones de enzimas detergentes, existen muchas manchas que son difíciles de eliminar por completo. Estos problemas se agravan por el creciente uso de bajas temperaturas de lavado (por ejemplo, agua fría) y ciclos de lavado más cortos. Así, es deseable disponer de enzimas amilolíticas que puedan actuar a baja temperatura y al mismo tiempo conservar o aumentar otras propiedades deseables tales como la actividad específica (actividad amilolítica), la estabilidad y/o la capacidad limpiadora.

45 Así, es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones limpiadoras que comprenden variantes de alfa-amilasas que se pueden utilizar en el lavado de ropa, lavado de vajillas y/o procesos de limpieza a baja temperatura, tales como temperaturas de 5-35 °C. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar variantes de alfa-amilasa que tengan una capacidad limpiadora mejorada a baja temperatura en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º 1.

**Sumario de la invención**

60 En un primer aspecto, la invención proporciona una composición limpiadora que comprende:

(a) una variante de una alfa-amilasa progenitora, que comprende una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, en donde cada alteración es, independientemente, una sustitución, delección o inserción, y en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 y el sustituyente se selecciona del

grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y en donde la variante tiene al menos 80% o al menos 87%, pero menos de 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de cualquiera de las SEC ID N.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, y en donde la variante tiene una actividad alfa-amilasa y una capacidad limpiadora mejorada a una temperatura de 5-35 °C en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º 1;

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

La invención también proporciona un método para tratar una superficie, preferentemente un material textil, que comprende (i) formar una solución de lavado acuosa que comprende agua y una composición limpiadora que comprende; y

10 (a) una variante de una alfa-amilasa progenitora, que comprende una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, en donde cada alteración es, independientemente, una sustitución, delección o inserción, y en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y en donde la variante tiene al menos 80% o al menos 87%, pero menos de 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de cualquiera de las SEC ID N.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, y en donde la variante tiene una actividad alfa-amilasa y una capacidad limpiadora mejorada a una temperatura de 5-35 °C en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º 1; y

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

20 (ii) tratar la superficie con la solución de lavado acuosa preferiblemente a una temperatura de 40 °C o menos, o más preferiblemente a una temperatura de 30 °C o menos, con máxima preferencia a una temperatura de 20 °C o menos; y (iii) enjuagar la superficie.

25 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición limpiadora que comprende: una variante de una alfa-amilasa progenitora, que comprende una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, en donde cada alteración es, independientemente, una sustitución, delección o inserción, y en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y en donde la variante tiene al menos 80% o al menos 87%, pero menos de 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de cualquiera de las SEC ID N.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, y en donde la variante tiene una actividad alfa-amilasa y una capacidad limpiadora mejorada a una temperatura de 5-35 °C en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º 1; y un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9% en peso.

35 La invención también proporciona un método para tratar una superficie, preferiblemente un material textil, que comprende (i) formar una solución de lavado acuosa que comprende agua y una composición limpiadora de ese tipo, (ii) tratar la superficie con la solución de lavado acuosa preferiblemente a una temperatura de 40 °C o menos, o más preferiblemente a una temperatura de 30 °C o menos, con máxima preferencia a una temperatura de 20 °C o menos; y (iii) enjuagar la superficie.

#### 40 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición limpiadora que comprende:

45 (a) una variante de una alfa-amilasa progenitora, que comprende una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, en donde cada alteración es, independientemente, una sustitución, delección o inserción, y en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y en donde la variante tiene al menos 80% o al menos 87%, pero menos de 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de cualquiera de las SEC ID N.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, y en donde la variante tiene una actividad alfa-amilasa y una capacidad limpiadora mejorada a una temperatura de 5-35 °C en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º 1; y

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

#### 55 Definiciones

60 **Actividad alfa amilasa:** La expresión "actividad alfa-amilasa" significa la actividad de las alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1, que constituye un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis del almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos lineales y ramificados con enlace 1,4-glucosídico.

65 **Variante:** El término "variante" se refiere a un polipéptido que tiene una actividad alfa-amilasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o delección, en una o más posiciones. Una sustitución significa una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

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

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

**Progenitor o alfa-amilasa progenitora:** El término “progenitor” o “alfa-amilasa progenitora” significa una alfa-amilasa en la que se ha realizado una alteración para producir variantes de la enzima de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido de origen natural (natural) o una variante del mismo.

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

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

**Polipéptido maduro:** El término “polipéptido maduro” significa un polipéptido, en su forma final después de la traducción, y cualquiera de sus modificaciones posteriores a la traducción tales como procesamiento del extremo N, truncamiento del extremo C, glicosilación, fosforilación, etc.

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

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

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

Para el objeto de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, mencionado anteriormente) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *y col.*, 2000, mencionado anteriormente), preferiblemente la versión 3.0.0 o versiones posteriores. Los parámetros opcionales utilizados tienen una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión para EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de Needle etiquetada como de “mayor identidad” (obtenida usando la opción –nobrief) se usa como identidad porcentual y se calcula de la siguiente forma:

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

**Fragmento:** El término “fragmento” significa un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos borrados del extremo amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; en donde el fragmento tiene actividad alfa-amilasa.

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

**Variante alélica:** El término “variante alélica” significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Las variaciones alélicas surgen naturalmente mediante mutación, y pueden dar como resultado el polimorfismo entre poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin

cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

5 **Polinucleótido aislado:** El término “polinucleótido aislado” significa un polinucleótido que está modificado por la mano humana. En un aspecto, el polinucleótido aislado es al menos 1% puro, *por ejemplo*, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90% puro, y al menos 95% puro, tal como se determina mediante electroforesis en gel de agarosa. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

10 **Polinucleótido sustancialmente puro:** La expresión “polinucleótido sustancialmente puro” significa una preparación de polinucleótido exenta de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para su uso en sistemas de producción de polipéptidos genomanipulados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6%, como máximo 5%, como máximo 4%, como máximo 3%, como máximo 2%, como máximo 1%, y como máximo 0.5% en peso de otro material polinucleotídico con el que está asociado de forma recombinante o natural. Un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir, sin embargo, regiones naturales 5’ y 3’ no traducidas, como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 90% puro, *por ejemplo*, al menos 92% puro, al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99% puro, y al menos 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma prácticamente pura.

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

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

30 **Construcción de ácido nucleico:** La expresión “construcción de ácido nucleico” significa una molécula de ácido nucleico, tanto monocatenaria como bicatenaria, que está aislada de un gen natural, o se ha modificado para incluir segmentos de ácidos nucleicos de una forma que no se produciría de forma natural o que es sintética. El término construcción de ácido nucleico es un sinónimo del término “casete de expresión” cuando la construcción de ácido nucleico incluye las secuencias de control necesarias para expresar una secuencia codificante de la presente invención.

35 **Secuencias de control:** La expresión “secuencias de control” significan todos los componentes necesarios para expresar un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser de origen natural o externo para el polinucleótido que codifica la variante, o naturales o externos entre sí. Dichas secuencias de control incluyen, aunque no de forma limitativa, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal, y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de detención de la transcripción y de la traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores que tienen el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la unión de las secuencias de control con la región codificadora del polinucleótido que codifica una variante.

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

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

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

55 **Célula hospedadora:** El término “célula hospedadora” significa cualquier tipo celular susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término “célula hospedadora” abarca cualquier progenie de una célula precursora que no sea idéntica a la célula precursora debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

60 **Proceso de eliminación de almidón:** La expresión “proceso de eliminación del almidón” se refiere a cualquier tipo de proceso por el que se elimina (o se convierte) el almidón, tal como en procesos de lavado donde el almidón se retira de

un material textil, tal como, por ejemplo, la limpieza textil tal como el lavado de ropa. Un proceso de eliminación de almidón también puede ser una limpieza de superficies duras tal como el lavado de vajilla o bien pueden ser procesos de limpieza generales tal como la limpieza industrial o de lugares públicos. La expresión también abarca otros procesos de eliminación del almidón o de conversión del almidón, producción de etanol, licuefacción de almidón, eliminación de apresto, producción de papel y pulpa, fabricación de cerveza y detergentes en general.

**Propiedad mejorada:** La expresión “propiedad mejorada” significa una característica asociada con una variante que se mejora en comparación con el precursor. Dichas propiedades mejoradas incluyen, aunque no de forma limitativa, actividad térmica, termoestabilidad, actividad de pH, estabilidad del pH, especificidad de sustrato/cofactor, propiedades superficiales mejoradas, especificidad de producto, mayor estabilidad o solubilidad en presencia de biomasa tratada, estabilidad mejorada en las condiciones de almacenamiento, y estabilidad química.

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

**Capacidad limpiadora mejorada:** En la presente memoria, la expresión “capacidad limpiadora mejorada” se define como una enzima variante que presenta una alteración en la capacidad limpiadora de una variante de amilasa con respecto a la capacidad limpiadora de la amilasa precursora o con respecto a una alfa-amilasa que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene la delección en una o más de las posiciones especificadas o relativas con la actividad de una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 4, por ejemplo, aumentando la eliminación de manchas. El término “capacidad limpiadora” incluye limpieza en general, por ejemplo, limpieza de superficies duras como en el lavado de vajillas, pero también la capacidad limpiadora de materiales textiles tal como en el lavado de ropa, y también en la limpieza industrial o de lugares públicos.

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

Convenciones para la designación de variantes

Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en la SEC ID N.º 1 se utiliza para determinar los correspondientes restos de aminoácidos en otra alfa-amilasa. La secuencia de aminoácidos de otra alfa-amilasa está alineada con el polipéptido maduro descrito en la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6 y, basándose en la alineación, el número de la posición del aminoácido correspondiente a cualquier resto de aminoácido del polipéptido maduro descrito en la SEC ID N.º 1 se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48. 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16. 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o una versión superior.

La identificación del correspondiente resto de aminoácido en otra alfa-amilasa se puede confirmar mediante alineación de múltiples secuencias polipeptídicas usando “ClustalW” (Larkin *et al.*, 2007, *Bioinformatics* 23: 2947-2948).

Cuando la otra enzima se ha separado del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, o SEC ID N.º 6 de tal forma que la comparación tradicional basada en secuencias no consigue detectar su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, *J. Mol. Biol.* 295. 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de emparejamiento de secuencias. Se puede conseguir una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles mediante un proceso iterativo de búsqueda en bases de datos, y puede detectar homólogos remotos (Atschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25. 3389-3402). Se puede conseguir incluso una mayor sensibilidad si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras proteicas. Programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, *J. Mol. Biol.* 287. 797-815; McGuffin y Jones, 2003, *Bioinformatics* 19: 874-881) utilizan la información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineamiento estructural, y potenciales de solvatación) como entrada de una red neuronal que predice el plegado estructural de una secuencia solicitada. Análogamente, el método de Gough *et al.*, 2000, *J. Mol. Biol.* 313. 903-919, se puede usar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de la superfamilia presentes en la base de datos SCOP. A su vez, estos alineamientos se pueden usar para generar modelos de homología del polipéptido, y dichos modelos se pueden evaluar para determinar la precisión usando una variedad de herramientas desarrolladas a tal fin.

Para las proteínas de estructura conocida, están disponibles diferentes herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas SCOP se han alineado estructuralmente, y dichas alineaciones están disponibles y se pueden descargar. Se pueden alinear dos o más estructuras proteicas usando una

variedad de algoritmos tal como la matriz de distancia de alineamiento (Holm y Sander, 1998, *Proteins* 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, *Protein Engineering* 11: 739-747), y las implementaciones de dichos algoritmos se pueden utilizar adicionalmente para investigar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (*por ejemplo*, Holm y Park, 2000, *Bioinformatics* 16: 566-567).

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

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

**Deleciones.** En las deleciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición\*. Por tanto, la delección de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195\*" o "G195\*". Las deleciones múltiples están separadas por signos de suma ("+"), *por ejemplo*, "Gly195\* + Ser411\*" o "G195\* + S411\*".

**Inserciones.** En las inserciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Por tanto, 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".

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

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

**Múltiples alteraciones.** Las variantes que comprenden múltiples alteraciones se separan por signos de suma ("+"), *por ejemplo*, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E" que representan una sustitución de tirosina y ácido glutámico por arginina y glicina en las posiciones 170 y 195, respectivamente.

**Diferentes sustituciones.** Cuando se pueden introducir diferentes sustituciones en una posición, las diferentes sustituciones se separan con una coma, *por ejemplo*, "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina por tirosina o ácido glutámico en la posición 170. Así, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las siguientes variantes:

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

#### Alfa-amilasas precursoras

La alfa-amilasa precursora puede ser un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1.

En un aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1.

El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 1. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1.

En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1.

La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 2.

En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 2 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del

precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 2.

5 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 2. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 2.

En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 2.

10 La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 3.

15 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 3 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 3.

20 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 3. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 3.

En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 3.

25 La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 4.

30 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 4 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 4.

35 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 4. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 4.

En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 4.

40 La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 5.

45 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 5 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 5.

50 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 5. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 5.

En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 5.

55 La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 6.

60 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 6 de al menos 80, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 6.

65 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 6. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 6.

En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 6.

La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 7.



- 5 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 7 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 7.
- 10 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 7. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 7.
- 15 En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 7.
- 20 La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 8.
- 25 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 8 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 8.
- 30 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 8. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 8.
- 35 En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 8.
- 40 La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 9.
- 45 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 9 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 9.
- 50 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 9. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 9.
- 55 En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 9.
- 60 La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 10.
- 65 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 10 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 10.
- El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 10. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 10.
- En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 10.
- La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 11.
- En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 11 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 11.
- El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 11. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 11.

En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 11.

La alfa-amilasa precursora puede ser también un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 80% con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 12.

5 En otro aspecto, el precursor tiene una identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 12 de al menos 80%, *por ejemplo*, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del precursor difiere en no más de diez aminoácidos, *por ejemplo*, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 12.

10 El precursor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 12. En otro aspecto, el precursor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 12.

15 En otra realización, el precursor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 12.

La secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 1, SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 3, SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 6, SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 12 o uno de sus fragmentos, puede utilizarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica un precursor a partir de cepas de géneros o especies diferentes de conformidad con métodos de uso común en la técnica. En particular, dichas sondas se pueden utilizar para hibridar con ADN genómico o ADNc del género o especie de interés, según los procedimientos de transferencia Southern normalizados, para identificar y aislar el gen correspondiente del anterior. Dichas sondas pueden ser notablemente más cortas que la secuencia completa, pero debería tener al menos 14, *por ejemplo*, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene al menos 100 nucleótidos de longitud, *por ejemplo*, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas están normalmente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, biotina, o avidina). Dichas sondas están abarcadas en la presente invención.

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

40 Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda nucleotídica marcada correspondiente a un polinucleótido que codifica la SEC ID N.º: 1, SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 3, SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 6, SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 12, o una subsecuencia del mismo; en condiciones de rigurosidad de baja a muy alta. Las moléculas con las que la sonda se hibrida se pueden detectar usando, por ejemplo, una película de rayos X o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

45 En un aspecto, la sonda de ácido nucleico es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N.º: 1, SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 3, SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 6, SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 12, o un fragmento de la misma.

50 Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de rigurosidad de muy baja a muy alta se definen como prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado, y bien formamida al 25% para rigurosidad muy baja y baja, formamida al 35% para rigurosidad media y media-alta, o formamida al 50% para rigurosidad alta y muy alta, seguido por los procedimientos convencionales de transferencia Southern durante 12 a 24 horas, óptimamente. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una de ellas durante 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0,2% SDS a 45 °C (rigurosidad muy baja), 50 °C (rigurosidad baja), 55 °C (rigurosidad media), 60 °C (rigurosidad media-alta), 65 °C (rigurosidad alta), o 70 °C (rigurosidad muy alta).

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

65

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

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

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

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

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

El precursor puede ser una alfa-amilasa fúngica. Por ejemplo, el precursor puede ser una alfa-amilasa de levadura tal como una alfa-amilasa de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*. Por ejemplo, el precursor puede ser una alfa-amilasa de hongo filamentoso tal como una alfa-amilasa de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holmastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, o *Xylaria*.

En otro aspecto, el precursor es una alfa-amilasa de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis*.

En otro aspecto, el precursor es una alfa-amilasa de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spedeodonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

En otro aspecto, el precursor es una alfa-amilasa de *Bacillus* sp., *por ejemplo*, la alfa-amilasa de la SEC ID N.º: 1, SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 3, SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5, o SEC ID N.º: 6.

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

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

El precursor se puede identificar y obtenerse de otras fuentes, incluidos microorganismos aislados de la naturaleza (*por ejemplo*, suelo, compost, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (*por ejemplo*, suelo, compost, agua, etc.) usando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales son bien conocidos en la técnica. El polinucleótido que codifica un precursor se puede derivar a continuación mediante cribado análogo de una

genoteca de ADN genómico o ADNc o de otro microorganismo o de una muestra de ADN mixto. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica un precursor con una sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas conocidas del experto en la técnica (véase, *por ejemplo*, Sambrook y col., 1989, *supra*).

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

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

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, aunque no de forma limitativa, los sitios descritos en Martin y col., 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3: 568-576; Svetina y col., 2000, *J. Biotechnol.* 76: 245-251; Rasmussen-Wilson y col., 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3488-3493; Ward y col., 1995, *Biotechnology* 13: 498-503; y Contreras y col., 1991, *Biotechnology* 9: 378-381; Eaton y col., 1986, *Biochemistry* 25: 505-512; Collins-Racie y col., 1995, *Biotechnology* 13: 982-987; Carter y col., 1989, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 6: 240-248; y Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48.

#### 25 Preparación de variantes

El método para obtener una variante que tiene actividad alfa-amilasa puede comprender: (a) introducir en una alfa-amilasa precursora una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones 140, 181, 189, 134, 260, 262, 284, 304, 347, 439, 469, 476 y 477 en donde una o más de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y opcionalmente además una adición que introduce una o más alteraciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 195, 206, 243 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, o SEC ID N.º 12, en donde la numeración es según la SEC ID N.º 1 y la variante tiene actividad alfa-amilasa; y (b) recuperar la variante.

En un aspecto un método para obtener una variante útil en la presente invención que tiene actividad alfa-amilasa puede comprender: (a) introducir en una alfa-amilasa precursora una alteración en dos o más posiciones correspondientes a W140, R181, W189, D134, E260, F262, W284, G304, W347, W439, W469, G476, y G477, una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y opcionalmente además una adición que introduce una o más alteraciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 195, 206, 243 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, o SEC ID N.º 12, en donde la numeración es según la SEC ID N.º 1 y la variante tiene actividad alfa-amilasa; y (b) recuperar la variante.

En una realización, la alteración introducida es una sustitución.

En otra realización, el método para obtener una variante que tiene actividad alfa-amilasa puede comprender: (a) introducir en una alfa-amilasa precursora una sustitución en dos o más posiciones correspondientes a G304RKEQ, W140YF, W189EGT, D134E, E260GHIKRTY, F262GP, W284DHFYR, W347HFY, W439RG, G476EQRK, G477EQKMR del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, o SEC ID N.º 12, en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y en donde la numeración es según la SEC ID N.º 1 y la variante tiene actividad alfa-amilasa; y (b) recuperar la variante.

En una realización preferida, las sustituciones introducidas son dos o más de G304R, W140YF, W189EGT, D134E, E260GHIKRTY, W284DFR, W439RG, G476EK, G477EKMR, de las que una sustitución es E260GHIKRTY. En una realización más preferida, las sustituciones introducidas son G304R, W140YF, E260GHIKPRTY y G476EQRK. En una realización incluso más preferida, el método para obtener una variante que tiene actividad alfa-amilasa comprende: (a) introducir en una alfa-amilasa precursora sustituciones de G304R, W140Y, E260G y G476K en cualquiera de las SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, o SEC ID N.º 12, en donde la numeración es según la SEC ID N.º 1 y la variante tiene actividad alfa-amilasa; y (b) recuperar la variante.

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

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

10 La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo *in vitro* mediante PCR que implica el uso de cebadores de oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis dirigida al sitio también se puede llevar a cabo *in vitro* mediante mutagénesis en casete que implica la escisión mediante una enzima de restricción en un sitio del plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el precursor y la posterior unión de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite crear extremos adherentes en el plásmido e inserciones para unirlos entre sí. Véase, *por ejemplo*, Scherer y Davis, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4949-4955; y Barton y col., 1990, *Nucleic Acids Res.* 18: 7349-4966.

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

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

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

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

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

45 La construcción de genes semisintéticos se lleva a cabo combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos, y/o la mutagénesis dirigida al sitio, y/o la mutagénesis aleatoria, y/o el intercambio. La construcción semisintética se tipifica por un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótido que se han sintetizado, combinado con técnicas de PCR. De esta forma, regiones definidas de los genes se pueden sintetizar *de novo*, mientras que otras regiones se pueden amplificar usando cebadores mutagénicos específicos de sitio, mientras que otras regiones adicionales se pueden someter a amplificación mediante PCR propensa a error o PCR no propensa a error. A continuación, las subsecuencias de polinucleótido se pueden intercambiar.

50 Variantes

Las variantes de una alfa-amilasa precursora útil en la presente invención comprenden una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1, y en donde cada alteración es independientemente una sustitución, inserción o deleción (preferiblemente una sustitución) en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y en donde la variante tiene actividad alfa-amilasa. Se proporcionan en el presente documento variantes que tienen una capacidad limpiadora mejorada a 5-35 °C, en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º: 1.

60 En una realización, la variante tiene una identidad secuencial de al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menor de 100%, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa precursora.

65 Las variantes útiles en la presente invención son variantes aisladas de alfa amilasa que comprenden una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262,

- 5 W284, W347, W439, W469, G476, y G477 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1, en donde cada alteración es, independientemente, una sustitución, deleción o inserción, en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y en donde la variante tiene al menos 80% pero menos de 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de cualquiera de las SEC ID N.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, y en donde la variante tiene una actividad alfa-amilasa y una capacidad limpiadora mejorada a una temperatura de 5-35 °C en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º: 1.
- 10 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1.
- 15 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 2.
- 20 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3.
- 25 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 4.
- 30 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 5.
- 35 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 6.
- 40 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 7.
- 45 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 8.
- 50 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 9.
- 55 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 10.
- 60 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 11.
- 65 En otra realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad secuencial con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 12.
- En un aspecto, el número de alteraciones en las variantes de la presente invención es 1-20, *por ejemplo*, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.
- En un aspecto, una variante comprende una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477. En otro aspecto, una variante comprende una alteración en dos posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477. En otro aspecto, una variante comprende una alteración en tres posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477. En otro aspecto, una variante comprende una alteración en cuatro posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347,

W439, W469, G476, y G477. En otro aspecto, una variante comprende una alteración en cinco posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477. En otro aspecto, una variante comprende una alteración en seis posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477.

5 En otro aspecto, una variante comprende una alteración en cada posición correspondientes a cualquiera de las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477. Las posiciones corresponden a las posiciones de la SEC ID N.º: 1. Es preferible que las alteraciones sean sustituciones.

10 En una realización, la variante comprende una sustitución en dos, tres o cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477, comprendiendo también opcionalmente una sustitución en una, dos, o tres posiciones seleccionadas del grupo que corresponde a las posiciones N195, V206 y Y243.

15 En una realización preferida, la variante comprende una sustitución en dos, tres o cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304, W140, E260 y G476, en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y.

20 En un aspecto de la invención, la variante comprende dos o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en G304RKEQ, W140YF, W189EGT, D134E, E260GHIKRTY, F262GP, W284DHFYR, W347Hfy, W439RG, G476EQRK, G477EQKMR, en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y.

25 Se prefiere que la variante de acuerdo con la invención comprenda sustituciones en dos, tres o cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304R, W140YF, E260GHIKNPRTY y G476EQRK. En una realización más preferida, las sustituciones en las dos, tres o cuatro posiciones se seleccionan del grupo que consiste en G304R, W140Y, E260G y G476K.

30 En una realización, la variante comprende además una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en T511L, S52Q, N54K, G109A, E194D, N195F, V206Y, Y243F, G109A, G273DV, G337N, K72R, R181H, S303G y Y100I. En una realización preferida, la una o más sustituciones adicionales se seleccionan del grupo que consiste en N195F, V206Y, Y243F. Preferiblemente, la variante comprende dos o tres de dichas sustituciones. Se proporcionan en el presente documento variantes que tienen una capacidad limpiadora mejorada a baja temperatura, así como una estabilidad mejorada frente al agotamiento del Ca<sup>2+</sup>, en comparación con la alfa-amilasa precursora o en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

35 En otro aspecto, la variante útil en la presente invención comprende dos o más sustituciones del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1, SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 3, SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 6, SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12, seleccionadas del grupo que consiste en D134E, E260G, E260H, E260I, E260K, E260N, E260R, E260T, G109A, G273D, G273V, G337N, G476E, G477E, G477M, G477R, K72R, R181H, S303G, W140F, W140Y, W189E, W189G, W189T, W284D, e Y100I.

45 Las variantes pueden también comprender una alteración en una o más posiciones adicionales. Por ejemplo, las variantes pueden comprender una alteración en una posición que corresponde a las posiciones N195F+V206Y+Y243F y/o G182\*+D183\* o D183\*+G184\*.

En otro aspecto, la invención se refiere a variantes que comprenden sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones del polipéptido de la SEC ID N.º: 1, seleccionadas del grupo que consiste en:

50 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G477E,

W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260T+W284D,

55 G109A+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

N195F+V206Y+Y243F+E260K+W284D,

60 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G476E,

W140Y+W189G+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+S303G,

65 W140Y+W189T+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+W284D,  
 Y100I+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 5 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G337N,  
 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
 10 G109A+ W140Y+ E194D+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
 G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
 15 T51I+ Y100I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
 T51I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
 T51I+ S52Q+ N54K+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
 20 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G304R+ G476K  
 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284R+ G477K  
 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284F+ G477R, y  
 25 N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D.

En otro aspecto, la invención se refiere a variantes que consisten en sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones del polipéptido de la SEC ID N.º: 1, seleccionadas del grupo que consiste en:

30 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G477E,  
 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260T+W284D,  
 35 G109A+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 N195F+V206Y+Y243F+E260K+W284D,  
 40 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G476E,  
 W140Y+W189G+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 45 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+S303G,  
 W140Y+W189T+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+W284D,  
 50 Y100I+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G337N,  
 55 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
 G109A+ W140Y+ E194D+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
 G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
 60 T51I+ Y100I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
 T51I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
 65 T51I+ S52Q+ N54K+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E



## ES 2 608 964 T3

W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G304R+ G476K

W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284R+ G477K

5 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284F+ G477R, y  
N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D.

10 En otro aspecto adicional, las variantes adecuadas comprenden alteraciones en las posiciones correspondientes a las posiciones del polipéptido de la SEC ID N.º: 1, seleccionadas del grupo que consiste en:

D183\*+ G184\*+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G477E,

15 D183\*+ G184\*+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260T+W284D,

D183\*+ G184\*+G109A+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

20 D183\*+ G184\*+ N195F+V206Y+Y243F+E260K+W284D,

D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G476E,

25 D183\*+ G184\*+ W140Y+W189G+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+S303G,

D183\*+ G184\*+ W140Y+W189T+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

30 D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+W284D,

D183\*+ G184\*+ Y100I+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

35 D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G337N,

D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R

D183\*+ G184\*+ G109A+ W140Y+ E194D+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G

40 D183\*+ G184\*+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E

D183\*+ G184\*+ T51I+ Y100I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G

45 D183\*+ G184\*+ T51I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R

D183\*+ G184\*+ T51I+ S52Q+ N54K+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E

D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G304R+ G476K

50 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284R+ G477K

D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284F+ G477R, y

D183\*+ G184\*+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D.

55 En otro aspecto, las variantes adecuadas consisten en alteraciones en las posiciones correspondientes a las posiciones del polipéptido de la SEC ID N.º: 1, seleccionadas del grupo que consiste en:

D183\*+ G184\*+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G477E,

60 D183\*+ G184\*+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260T+W284D,

D183\*+ G184\*+G109A+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

65 D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

- D183\*+ G184\*+ N195F+V206Y+Y243F+E260K+W284D,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G476E,  
 5 D183\*+ G184\*+ W140Y+W189G+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+S303G,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+W189T+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 10 D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+W284D,  
 D183\*+ G184\*+ Y100I+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 15 D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G337N,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
 D183\*+ G184\*+ G109A+ W140Y+ E194D+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
 20 D183\*+ G184\*+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
 D183\*+ G184\*+ T51I+ Y100I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
 25 D183\*+ G184\*+ T51I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
 D183\*+ G184\*+ T51I+ S52Q+ N54K+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G304R+ G476K  
 30 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284R+ G477K  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284F+ G477R, y  
 35 D183\*+ G184\*+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D.

Los aminoácidos esenciales de un precursor se pueden identificar mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de detección de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de una única alanina en cada resto de la molécula y las moléculas mutadas resultantes se evalúan para determinar su actividad con el fin de identificar los restos de aminoácidos que son cruciales para la actividad alfa-amilasa de la molécula. Véase también, Hilton y col., 1996, *J. Biol. Chem.* 271. 4699-4708. El sitio activo de la alfa-amilasa u otra interacción biológica también puede ser determinado mediante análisis de la estructura física mediante técnicas como, p. ej., resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o etiquetado de fotoafinidad, junto con la mutación de nuevos sitios de contacto de aminoácidos. Véase, por ejemplo, de Vos y col., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith y col., 1992, *J. Mol. Biol.* 224. 899-904; Wlodaver y col., 1992, *FEBS Lett.* 309. 59-64. Las identidades de los aminoácidos esenciales también se pueden inferir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con el precursor.

#### Composiciones

La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una variante de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en dicha variante. El término "enriquecida" significa que la actividad alfa-amilasa de la composición se ha aumentado, *por ejemplo*, con un factor de enriquecimiento de 1.1.

La composición puede comprender una variante como componente enzimático principal, *por ejemplo*, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasas. La enzima o enzimas adicionales se pueden producir, por ejemplo, mediante un microorganismo que pertenece al género *Aspergillus*, *por ejemplo*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, *por ejemplo*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides*, o

*Fusarium venenatum; Humicola, por ejemplo, Humicola insolens o Humicola lanuginosa; o Trichoderma, por ejemplo, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, o Trichoderma viride.*

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

#### Composiciones limpiadoras

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

20 Dichas composiciones limpiadoras comprenden un adyuvante limpiador/detergente, preferiblemente una mezcla de componentes. De forma típica, el adyuvante limpiador estará presente en la composición en una cantidad de 0,001 a 99,9% en peso, de forma más típica de 0,01 a 80% en peso de adyuvante de limpieza. Los adyuvantes de limpieza adecuados comprenden: tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, blanqueadores, catalizadores del blanqueador, colorantes, reforzadores del blanqueador, agentes quelantes, agentes de transferencia de colorantes, adyuvantes de deposición, tensioactivos, enzimas adicionales, y estabilizantes de enzimas, materiales catalíticos,  
25 activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, abrillantadores ópticos, fotoactivadores, fluorescente, agentes matizadores de tejidos, acondicionadores de tejidos, perácidos preformados, tensioactivos poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de manchas de arcilla, sales de carga, hidrótrofos, abrillantadores, supresores de jabonaduras, agentes elastificadores de estructuras, suavizantes de tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes antiencogimiento, germicidas, fungicidas,  
30 agentes contra el deslustre, agentes anticorrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, vehículos, auxiliares de procesamiento, pigmentos, perfumes, agentes de control del pH, encapsulados, polímeros. Por ejemplo, estos pueden incluir ingredientes blanqueadores tales como un reforzador del blanqueador de imina; fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato y/o perborato, especialmente percarbonato recubierto con un material tal como una sal de carbonato y/o de sulfato, sal de silicato, borosilicato, y cualquier mezcla de los anteriores; perácido preformado, incluido perácido preformado en forma encapsulada; catalizadores de metales de transición; supresores de jabonaduras o sistemas supresores tales como supresores de jabonaduras basados en silicón y/o supresores de jabonaduras basados en ácidos grasos; suavizantes de tejidos tales como arcilla, silicón y/o compuestos de amonio cuaternario; floculantes tales como poli(óxido de etileno); inhibidores de transferencia de colorantes tales como polivinilpirrolidona, poli(N-óxido de 4-vinilpiridina) y/o copolímero de vinilpirrolidona y  
40 vinilimidazol; componentes para la integridad de tejidos tales como oligómeros producidos por la condensación de imidazol y epiclorhidrina; dispersantes de la suciedad y coadyuvantes antirredeposición de suciedad tales como poliaminas alcoxiladas y polímeros de etilenimina etoxilada; componentes antirredeposición, tales como poliésteres; polímeros de carboxilato tales como polímeros de ácido maleico o copolímeros de ácido maleico y acrílico; perfumes tales como microcápsulas de perfume; acordes encapsulados en almidón, perfumes depositados mediante pulverización; anillos de jabón; partículas estéticas; tintes; cargas como sulfato sódico, aunque se prefiere que la composición esté prácticamente exenta de cargas; sal de silicato como el silicato sódico, incluidos el silicato sódico 1.6R y 2.0R, o metasilicato sódico; copoliésteres de ácidos dicarboxílicos y dioles; polímeros celulósicos como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietoxilcelulosa u otras celulosas alquílicas o alquilalcoxílicas; disolventes tales como 1,2-propanodiol, monoetanolamina; dietilenglicol, etanol y cualquier mezcla de los anteriores; hidrótrofos  
50 tales como cumenosulfonato de sodio, xilenosulfonato de sodio, toluenosulfonato de sodio, y cualquiera de sus mezclas; ácidos orgánicos tales como ácido cítrico; y cualquier combinación de los mismos.

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

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

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

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

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

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

15 microbiana o/y una proteasa de tipo tripsina. Los ejemplos de proteasas neutras o alcalinas adecuadas incluyen: (a) subtilisinas (EC 3.4.21.62), incluidas las derivadas de *Bacillus*, tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en los documentos US-6.312.936 B1, US-5.679.630, US-4.760.025, US-7.262.042 y WO09/021867.

20 (b) proteasas del tipo tripsina o tipo quimiotripsina, tales como tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) incluidas la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y las proteasas de quimiotripsina derivadas de *Cellulomonas* descrita en WO 05/052161 y WO 05/052146.

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

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

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

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

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

45 Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US-4.435.307, US-5.648.263, US-5.691.178, US-5.776.757, WO09/148983, US-7.141.403B2 y WO 89/09259.

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

(a) un polipéptido bacteriano endógeno para un miembro del género *Bacillus* que tiene una secuencia con una identidad de al menos 90%, 94%, 97% e incluso del 99% con la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º2 del US-7.141.403B2;

55 (b) una glicosil hidrolasa que tiene actividad enzimática tanto frente a xiloglucano como frente a sustratos de celulosa amorfa, en donde la glicosil hidrolasa se selecciona de familias de 5, 12, 44 o 74 GH;

- (c) una glicosil hidrolasa que tiene una secuencia con una identidad de al menos 90%, 94%, 97% e incluso del 99% con la secuencia de la SEC ID N.º:3 del WO09/148983;  
 (d) y mezclas de los mismos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65

Los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en polímeros que contienen cromógenos covalentemente unidos, a veces denominados conjugados, (conjugados de tinte polimérico), por ejemplo, polímeros con cromógenos copolimerizados en la cadena principal del polímero y mezclas de los mismos. Tintes poliméricos incluyen los descritos en WO2011/98355, WO2011/47987, US-2012/090102, WO2010/145887, WO2006/055787 y WO2010/142503.

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

Tintes matizadores preferidos incluyen los agentes de blanqueamiento encontrados en WO 08/87497 A1, WO2011/011799 y WO2012/054835. Agentes de matizado preferidos para usar en la presente invención pueden ser los tintes preferidos descritos en dichas referencias, incluidos los seleccionados de los Ejemplos 1-42 de la Tabla 5 de WO2011/011799. En US-8138222 se describen otros tintes preferidos.

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

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

En otro aspecto, los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en Ultramarine Blue (nombre C.I. Pigment Blue 29), Ultramarine Violet (C.I. Pigment Violet 15) y mezclas de los mismos. Aditivos reforzantes de la detergencia - La composición limpiadora puede comprender además aditivos reforzantes de la detergencia, tales como aditivos reforzantes de la detergencia de tipo carbonato, bicarbonato o silicatos, que pueden ser zeolitas tales como Zeolita A, Zeolita MAP (Maximum Aluminium type P). Las zeolitas de utilidad para el lavado de ropa tienen preferiblemente la fórmula  $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$  y el tamaño de partículas suele estar comprendido entre 1-10  $\mu\text{m}$  para la zeolita A y 0,7-2  $\mu\text{m}$  para la zeolita MAP. Otros aditivos reforzantes de la detergencia son metasilicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) fuertemente alcalina y preferiblemente utilizada en el lavado de vajillas. En realizaciones preferidas, la cantidad de aditivo reforzante de la detergencia puede ser superior a 5%, superior a 10%, superior a 20%, superior a 30%, superior a 40% o superior a 50%, y puede ser inferior a 80%, 65%. En un detergente para lavado de vajillas, el nivel de aditivo reforzante de la detergencia es de forma típica 40-65%, especialmente 50-65% o incluso 75-90%.

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

En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en perfumes; abrillantadores; tintes; repelentes de insectos; siliconas; ceras; agentes saborizantes; vitaminas; agentes suavizantes de tejidos; agentes para el cuidado de la piel, en un aspecto, parafinas; enzimas; agentes antibacterianos;

blanqueadores; estimulantes sensoriales; y mezclas de los mismos; y dicha envoltura puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en polietilenos; poliamidas; poliestirenos; poliisoprenos; policarbonatos; poliésteres; poliacrilatos; aminoplastos, en un aspecto, dicho aminoplasto puede comprender poliureas, poliuretano, y/o poliureauretano, en un aspecto, dicha poliurea puede comprender polioximetilenurea y/o melamina formaldehído; poliolefinas; polisacáridos, en un aspecto dicho polisacárido puede comprender alginato y/o quitosana; gelatina; goma laca; resinas epoxi; polímeros de vinilo; compuestos inorgánico insolubles en agua; silicona; y mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender perfume. Dichos encapsulados son microcápsulas de perfume.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En un aspecto, la composición puede comprender un estabilizador de enzima seleccionado del grupo que consiste en (a) sales inorgánicas seleccionadas del grupo que consiste en sales de calcio, sales de magnesio y

mezclas de las mismas; (b) carbohidratos seleccionados del grupo que consiste en oligosacáridos, polisacáridos y mezclas de los mismos; (c) inhibidores de la proteasa reversibles eficaces para masa seleccionados del grupo que consiste en ácido fenilborónico y derivados de los mismos; y (d) mezclas de los mismos.

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

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

Polímeros

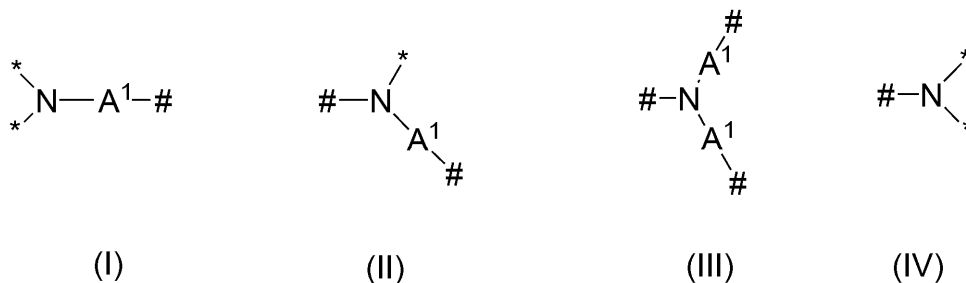
15 El producto de consumo puede comprender uno o más polímeros. Los ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinil-pirrolidona), poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpiririna-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico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

20 Polímeros anfífilicos limpiadores

Preferiblemente, el polímero limpiador anfífilico es un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>)(CH<sub>3</sub>)-N<sup>+</sup>-C<sub>x</sub>H<sub>2x</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)-bis((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo.

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

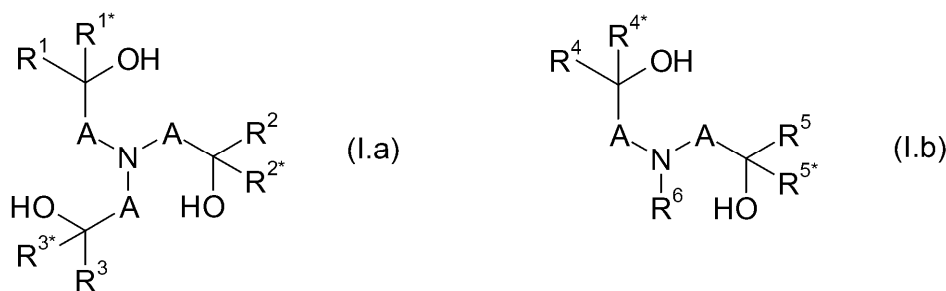
La estructura de núcleo puede comprender una estructura de polialquilenimina que comprende, en forma condensada, unidades repetidas de fórmulas (I), (II), (III) y (IV):



35 en donde # denota, en cada caso, una mitad de un enlace entre un átomo de nitrógeno y la posición de unión libre de un grupo A<sup>1</sup> de dos unidades repetitivas adyacentes que tienen las fórmulas (I), (II), (III) o (IV); \* en cada caso denota una mitad de un enlace a uno de los grupos alcoxilato; y A<sup>1</sup> se selecciona, independientemente de  
40 alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado; en donde la estructura de la polialquilenimina consiste en 1 unidad repetitiva de fórmula (I), x unidades repetitivas de fórmula (II), y unidades repetitivas de fórmula (III), y+1 unidades repetitivas de fórmula (IV), en donde x e y tienen, en cada caso, un valor en el intervalo de 0 a aproximadamente 150; en donde el peso molecular promedio P<sub>m</sub> de la estructura de núcleo de polialquilenimina es un valor en el  
45 intervalo de aproximadamente 60 g/mol a aproximadamente 10.000 g/mol.

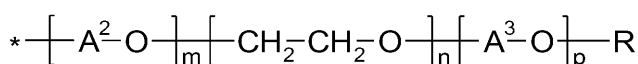
La estructura de núcleo puede comprender alternativamente una estructura de polialcanolaminas de los productos de condensación de al menos un compuesto seleccionado de N-(hidroxialquil)aminas de fórmulas (I.a) y/o (I.b),





en donde A se selecciona independientemente de alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; R<sup>1</sup>, R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>2\*</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>4\*</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5\*</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, o arilo, en donde los últimos tres radicales mencionados pueden estar opcionalmente sustituidos; y R<sup>6</sup> se selecciona de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo, en donde los tres últimos radicales mencionados pueden estar opcionalmente sustituidos.

La pluralidad de grupos alquilenoxi unidos a la estructura de núcleo se selecciona independientemente de unidades alquilenoxi de la fórmula (V)



(V)

en donde \* denota en cada caso, una mitad de un enlace al átomo de nitrógeno de la unidad repetitiva de la fórmula (I), (II) o (IV); A<sup>2</sup> se selecciona, en cada caso, independientemente de 1,2-propileno, 1,2-butileno y 1,2-isobutileno; A<sup>3</sup> es 1,2-propileno; en cada caso R, se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; m tiene un valor promedio en el intervalo de 0 a aproximadamente 2; n tiene un valor promedio en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50; y p tiene un valor promedio en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 50.

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

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

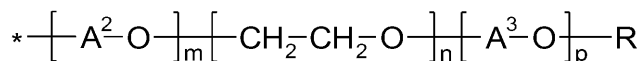
Puesto que la ciclación puede producirse en la formación de la cadena principal de tipo polialquilenimina, también es posible que los restos amino cíclicos estén presentes en pequeña cantidad en la cadena principal. Dichas polialquileniminas que contienen restos amino cíclicos están, por supuesto, alcoxiladas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

La cadena principal de tipo polialquilenimina que consiste en los átomos de nitrógeno y en los grupos A<sup>1</sup> tiene un peso molecular promedio P<sub>m</sub> de aproximadamente 60 g/mol a aproximadamente 10.000 g/mol, preferiblemente de aproximadamente 100 g/mol a aproximadamente 8000 g/mol y, más preferiblemente, de aproximadamente 500 g/mol a aproximadamente 6000 g/mol.

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

Los radicales A<sup>1</sup> que conectan los átomos de nitrógeno de los grupos amino pueden ser radicales alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> lineales o ramificados, idénticos o diferentes como, por ejemplo, 1,2-etileno, 1,2-propileno, 1,2-butileno, 1,2-isobutileno, 1,2-pentanodiilo, 1,2-hexanodiilo o hexametileno. Un alquileo ramificado preferido es 1,2-propileno. Son un alquileo lineal preferido el etileno y el hexametileno. Un alquileo más preferido es el 1,2-etileno.

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



(V)

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

A<sup>2</sup> se selecciona, en cada caso, de 1,2-propileno, 1,2-butileno y 1,2-isobutileno; preferiblemente A<sup>2</sup> es 1,2-propileno. A<sup>3</sup> es 1,2-propileno; En cada caso, R se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> como, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo; preferiblemente, R es hidrógeno. El índice m tiene, en cada caso, un valor de 0 a aproximadamente 2; preferiblemente, m es 0 o aproximadamente 1; más preferiblemente, m es 0. El índice n tiene un valor promedio en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 22 a aproximadamente 40 y, más preferiblemente, en el intervalo de aproximadamente 24 a aproximadamente 30. El índice p tiene un valor promedio en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 11 a aproximadamente 40 y, más preferiblemente, en el intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 30.

Preferiblemente, la unidad alcoxi de fórmula (V) es una secuencia no al azar de bloques de tipo alcoxilato. Por secuencia no al azar quiere decirse que el [-A<sup>2</sup>-O]<sub>m</sub> se añade primero (es decir, en la posición más cercana al enlace con el átomo de nitrógeno de la unidad repetitiva de fórmula (I), (II), o (III)); el [-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O]<sub>n</sub> se añade en segunda posición, y el [-A<sup>3</sup>-O]<sub>p</sub> se añade en tercera posición. Esta orientación proporciona a la polialquilenimina alcoxilada un bloque de poli(óxido de etileno) interior y un bloque de óxido de polipropileno exterior.

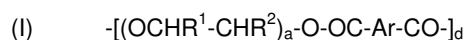
La parte sustancial de estas unidades alquilenoxi de fórmula (V) está formada por las unidades etilenoxi [-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O]<sub>n</sub> y las unidades propilenoxi [-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)-O]<sub>p</sub>. Las unidades alquilenoxi pueden tener adicionalmente también una pequeña proporción de unidades propilenoxi o butilenoxi [-A<sup>2</sup>-O]<sub>m</sub>, es decir, la estructura principal de polialquilenimina saturada con átomos de hidrógeno puede hacerse reaccionar inicialmente con pequeñas cantidades de hasta aproximadamente 2 mol, especialmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 mol, en particular de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 mol, de óxido de propileno u óxido de butileno por mol de restos NH presentes, es decir, incipientemente alcoxilado.

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

Los polímeros anfífilicos alcoxilados limpiadores de grasa están presentes en los productos para el cuidado de tejidos y del hogar, incluidos, aunque no de forma limitativa detergentes de la presente invención a niveles en el intervalo de aproximadamente 0,05% a 10% en peso de la composición para el producto del cuidado de tejidos y del hogar. Las realizaciones de los productos para el cuidado de tejidos y del hogar pueden comprender de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% en peso. Más específicamente, las realizaciones pueden comprender de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 2,5% del polímero limpiador de grasa.

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

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



en donde:

a, b y c son de 1 a 200;

d, e y f son de 1 a 50;

5 Ar es un fenileno sustituido en 1,4;

sAr es fenileno sustituido en 1,3 en la posición 5 con SO<sub>3</sub>Me;

Me es Li, K, Mg/2, Ca/2, Al/3, amonio, mono-, di-, tri-, o tetraalquilamonio en donde los grupos alquilo son alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> o hidroxialquilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, o mezclas de los mismos;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se selecciona independientemente de H o C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> n-alquilo o iso-alquilo; y

10 R<sup>7</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> lineal o ramificado, o un alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> lineal o ramificado, o un grupo cicloalquilo con de 5 a 9 átomos de carbono, o un grupo arilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>, o un grupo arilalquilo C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub>.

Los polímeros para la liberación de la suciedad adecuados son los polímeros para la liberación de la suciedad de poliéster tales como los polímeros Repel-o-tex, incluidos Repel-o-tex SF, SF-2 y SRP6 suministrados por Rhodia. Otros polímeros de liberación de suciedad adecuados incluyen los polímeros Texcare, incluidos Texcare SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 y SRN325 comercializados por Clariant. Otros polímeros de liberación de suciedad adecuados son los polímeros Marloquest tales como Marloquest SL suministrado por Sasol.

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

25 El detergente puede incluir un sistema blanqueador, que puede comprender una fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador del blanqueador formador de perácido tal como una tetraacetiltilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueador puede comprender peroxiacidos de tipo, por ejemplo, la amida, imida, o sulfona. En general, cuando se utiliza un agente blanqueante, las composiciones de la presente invención pueden comprender de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 50% o incluso de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 25%, de agente blanqueante en peso de la composición de la invención limpiadora.

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

45 Las variantes de la enzima de la invención se pueden estabilizar usando agentes estabilizantes convencionales, y/o inhibidores de la proteasa por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol azucarado, sales tales como cloruro sódico y cloruro potásico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado del ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, o un aldehído péptido tal como aldehídos di-, tri- o tetrapéptidos o análogos de aldehído (bien en la forma de B1-B0-R en donde, R es H, CH<sub>3</sub>, CX<sub>3</sub>, CHX<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>X (X=halógeno), B0 es un resto de aminoácido simple (preferentemente con una cadena lateral alifática o aromática opcionalmente sustituida); y B1 consiste en uno o más restos de aminoácidos (preferiblemente uno, dos o tres) que comprende opcionalmente un grupo protector del extremo N, o como se describe en WO09118375, WO98/13459) o un inhibidor de proteasa de tipo proteico tal como RASI, BASI, WASI (inhibidores bifuncionales de alfa-amilasa/subtilisina de arroz, cebada y trigo) o Cl2 o SSI. La composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO 92/19709 y WO 92/19708 o US-6472364. En algunas modalidades, las enzimas empleadas en la presente invención se estabilizan por la presencia de fuentes solubles en agua de zinc (II), calcio (II) y/o iones (II) magnesio en las composiciones terminadas que proporcionan dichos iones a las enzimas, así como además otros iones de metal (p. ej., bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II), y oxovanadio(IV)).

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

65

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

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

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

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

#### Ejemplos

Ensayo pNP-G7 para determinar la actividad alfa-amilasa

La actividad alfa-amilasa se puede determinar según un método que utiliza el sustrato G7-pNP. G7-pNP es la abreviatura de 4,6-etilideno (G<sub>7</sub>)-*p*-nitrofenil(G<sub>1</sub>)- $\alpha$ ,D-maltoheptaósido, un oligosacárido bloqueado que se puede escindir mediante una endoamilasa, tal como una alfa-amilasa. Tras la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el kit digiere el sustrato hidrolizado adicionalmente para liberar una molécula PNP libre que tiene color amarillo y que por tanto se puede medir por espectrometría en el visible a  $\lambda=405$  nm (400-420 nm.). Los kits que contienen sustrato G7-pNP y alfa-glucosidasa están fabricados por Roche/Hitachi (cat. No.11876473).

Reactivos:

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

El reactivo alfa-glucosidasa contiene HEPES 52,4 mM, NaCl 87 mM, MgCl<sub>2</sub> 12,6 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,075 mM  $\geq$  4 kU/l de alfa-glucosidasa).

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

Tampón de dilución: MOPS 50 mM, Triton X100 (polietilenglicolp-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub> (n = 9-10))), al 0,05% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 8,0.

Procedimiento:

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

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

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

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

Descripción general de la capacidad limpiadora

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

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

30 Tabla 1: Condiciones experimentales AMSA

Dosificación del detergente líquido para lavado de ropa	5,7 g/l de detergente líquido europeo (EU), o 0,8 g/l de detergente líquido estadounidense (EE. UU.)
Volumen de la solución de ensayo	160 micro l
pH	en el estado en que se encuentra
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	20 °C
Dureza del agua	10 °dH, Ca <sup>2+</sup> :Mg <sup>2+</sup> : HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 3:1:6
Concentración de enzima en la solución de ensayo	0,8 – 1,2 mg/l
Material de ensayo	CS-28 (Almidón de arroz sobre algodón)

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

La dureza del agua se ajustó a 10 °dH mediante la adición de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, y NaHCO<sub>3</sub> (Ca<sup>2+</sup>:Mg<sup>2+</sup>: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 3:1:4,5) al sistema de ensayo. Tras el lavado, las telas se enjuagaron con agua corriente y se secaron.

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

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

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

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

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

5 Los resultados del ensayo de lavado de ropa AMSA sobre diferentes variantes se muestran en la Tabla 3. En el resultado, el índice es 100. El resultado de la capacidad de la alfa-amilasa precursora recibe el valor de 100 y los resultados de las variantes se comparan con este valor.

#### Capacidad limpiadora AMSA

10 La capacidad limpiadora de las variantes y las correspondientes alfa-amilasa precursoras se sometieron a ensayo según el método de ensayo AMSA como se describe en la sección Métodos. Los resultados se proporcionan como (capacidad de la variante menos la capacidad del blanco) dividido por la (capacidad del precursor menos la capacidad del blanco) multiplicado por 100, donde el blanco es la capacidad obtenida mediante el lavado en las mismas condiciones, pero en ausencia de alfa-amilasa. Finalmente se calculó el promedio de la capacidad  
15 relativa a las dos concentraciones 0,8 – 1,2 mg/l.

Los resultados se presentan en la Tabla 3.

#### 20 Ensayo de lavado con launderómetro (LOM)

El launderómetro (LOM) es un sistema de modelo de lavado a media escala que se puede aplicar para evaluar 12 condiciones de lavado diferentes de forma simultánea. Un LOM es, básicamente, un baño de agua grande de temperatura controlada con hasta 12 vasos de precipitados metálicos abiertos sumergidos en su interior. Cada vaso de precipitados constituye una pequeña lavadora de ropa de carga superior y, durante un experimento, cada uno de  
25 estos contendrá una solución de un sistema detergente/enzima específico, y las telas manchadas y no manchadas con las que se mide su capacidad. La tensión mecánica se consigue haciendo rotar un brazo giratorio, que agita el líquido del interior de cada vaso de precipitados. Como los vasos de precipitados del LOM no tienen tapa, es posible retirar muestras durante un experimento LOM para obtener información en línea durante el lavado.

30 El modelo LOM de sistema de lavado se utiliza principalmente en el ensayo a media escala de detergentes y enzimas en condiciones de lavado EE. UU. o LA/AP. En un experimento LOM, se pueden variar factores tales como la relación entre balasto y suciedad, y la relación entre solución de lavado y tejido. Por tanto, el LOM proporciona el vínculo entre los experimentos a pequeña escala como AMSA y minilavado, y los experimentos a  
35 escala completa que requieren más tiempo en lavadoras de ropa de carga superior.

Equipo: El baño de agua con 12 vasos de precipitados metálicos y un brazo giratorio con 500 o 1200 ml de capacidad de solución detergente. La temperatura está comprendida de 5 a 80 °C. El baño de agua debe rellenarse con agua desionizada. La velocidad de rotación se puede configurar de 70 a 120 rpm/min.

#### 40 Capacidad limpiadora LOM

La dureza del agua se ajustó a la dureza descrita a continuación mediante la adición de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y NaHCO<sub>3</sub>. Se prepararon soluciones de lavado con la cantidad deseada de detergente, temperatura y dureza del agua en un recipiente como se describe más adelante. El detergente se disolvió durante la agitación magnética durante  
45 10 min. (La solución de lavado se usó en un plazo de 30 a 60 min después de la preparación).

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

50 La agitación del vaso de precipitados fue 120 rpm. Se añadieron 2 muestras de almidón de arroz (CS-28) y balasto de suciedad a cada uno de los vasos de precipitados, y el lavado se llevó a cabo según la temporalización que se indica a continuación. Las muestras se enjuagaron con agua corriente fría durante 5 min. Las muestras se dejaron secar en la oscuridad durante la noche.

Textil: La muestra textil CS-28 (almidón de arroz sobre algodón) se obtuvo del Center for Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos.

60 Balasto de suciedad: Balasto de suciedad de almidón de arroz en algodón/poliéster (EMPA 162) se obtuvo del Center for Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos. Salsa de carne Bistro (063KC), batido lácteo Frij Chocolate, spaghetti Heinz (113KC), doble chocolate Herseys se obtuvieron de Warwick Equest Ltd, Unit 55, Consett Business Park, Consett, County Durham, DH8 6BN Reino Unido

65 Los resultados del ensayo de lavado LOM para diferentes variantes se muestra en la Tabla 3. En el resultado, el índice es 100. El resultado de la capacidad de la alfa-amilasa precursora (SEC ID N.º7) recibe el valor de 100 y los resultados de las variantes se comparan con este valor.

Tabla 2: Condiciones experimentales

	Condiciones europeas (EU)	Condiciones estadounidenses (EE. UU.)
Dosificación de detergente	5,77 g/l (detergente líquido)	0,78 g/l (detergente líquido)
Dureza del agua	15 °dH (Ca <sup>2+</sup> :Mg <sup>2+</sup> :HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 4:1:7,5)	6 °dH (Ca <sup>2+</sup> :Mg <sup>2+</sup> :HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 2:1:4,5)
Concentración de enzima en la solución de lavado	0,25 mg ep/l	0,08 mg ep/l
Volumen de la solución de ensayo	500 ml	800 ml
Tiempo de lavado	30 minutos	18 minutos
Rotación	120 rpm	
pH	en el estado en que se encuentra	
Temperatura	15 °C	

5 Los detergentes y los materiales de ensayo fueron los siguientes:

Detergente líquido para lavado de ropa	Condiciones europeas (EU): Líquido HDL (líquido de limpieza intensiva) normal como se describe en el Ejemplo 1A siguiente. Condiciones estadounidenses (EE. UU.): Líquido HDL (líquido de limpieza intensiva) normal como se describe en el Ejemplo 1B siguiente.
Material de ensayo	CS-28 (Almidón de arroz sobre algodón)
Balasto de suciedad	Almidón de arroz sobre poliéster/algodón (EMPA 162), salsa se carne Bistro (063KC), batido lácteo Frij Chocolate, spaghetti Heinz (113KC), doble chocolate Herseys (2 muestras de cada)

10 La capacidad limpiadora se midió como el brillo del color del textil lavado expresado en valores de remisión. Los valores de remisión se tomaron con un espectrofotómetro Macbeth 7000 Color Eye. Se midió cada una de las muestras secas. Como había riesgos de interferencia con el fondo, las muestras se colocaron encima de 4 capas de tejido durante la medición de la remisión. La remisión se midió a 460 nm. No se incluyó filtro UV. Se calculó un valor promedio para la remisión de las muestras.

15 Ejemplo 1

Capacidad limpiadora de los detergentes líquidos con alfa-amilasas en Europa (EU) (Ejemplo 1A) y Estados Unidos (Ejemplo 1B) (EE. UU.)

20 La capacidad limpiadora de la variante analizada y la correspondiente alfa-amilasa precursora (SEC ID N.º: 7) se analizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados se proporcionan como (capacidad de la variante menos la capacidad del blanco) dividido por la (capacidad del precursor menos la capacidad del blanco) multiplicado por 100; donde el blanco es la capacidad obtenida mediante el lavado en las mismas condiciones, pero en ausencia de alfa-amilasa.

25 Ejemplo 1A: Composición detergente para lavado de ropa líquido europeo de limpieza intensiva

<b>Ejemplo 1A</b>	(% peso)
Alquilbencenosulfonato sódico	11,7
Ácido cítrico	2,27
Ácido graso C <sub>12-18</sub>	0,82
Alquiletoxi 3 sulfato sódico	3,9
Etoxidado 1,5 de 7 alquilo C <sub>12-18</sub>	2,4
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(CH <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )-bis((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	0,66
Copolímero injertado al azar <sup>1</sup>	0,83
Quelante de tipo fosfonato	0,48
Abrillantador	0,091
Hidrótomo	0,95
Componentes minoritarios: tintes, perfumes, enzimas, estabilizadores de enzimas, disolventes, estructurantes, modificadores del pH	Resto

- 1 El copolímero de injerto al azar es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.
- 5

Ejemplo 1B: Composición detergente para lavado de ropa líquido estadounidense de limpieza intensiva

<b>Ejemplo 1B</b>	(% peso)
Alquiletoxi 1,8 sulfato sódico	17,29
Alquilbencenosulfonato sódico	7,73
Alquilsulfato ramificado	3,3
alquil C <sub>12-18</sub> 1,5-9etoxilato	1,31
Óxido de dimetilamina C <sub>12</sub>	1,03
Ácido cítrico	0,67
Ácido graso C <sub>12-18</sub>	1,52
Borato sódico (Bórax)	2,53
Polietilenimina etoxilada <sup>2</sup>	1,44
Quelante de tipo fosfonato	0,34
Hidrato de la sal disódica del ácido dihidroxibenceno-3,5-disulfónico	0,19
Abrillantador	0,29
Polímero anfifílico alcoxilado para limpiar grasa <sup>3</sup>	1,93
Componentes minoritarios: tintes, perfumes, enzimas, estabilizadores de enzimas, disolventes, estructurantes, modificadores del pH	Resto

<sup>2</sup> Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

- 10 <sup>3</sup> El polímero anfifílico alcoxilado es una polietileneimina (PM 600), preparado a partir de un polímero que se ha derivatizado para contener 24 grupos etoxilados por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH.

Tabla 3: Capacidad limpiadora

<b>Sustituciones de la SEC ID N.º:7 (numeración de acuerdo con la SEC ID N.º:1)</b>	<b>EE. UU. 20 °C AMSA</b>	<b>EE. UU. 15 °C TOM</b>	<b>EU 20 °C AMSA</b>	<b>EU 15 °C TOM</b>
N195F + V206Y + Y243F	85	113	94	100
E260I	99	115	103	126
E260K	108	107	119	125
W140Y + N195F + V206Y + Y243F	104	108	110	104
N195F + V206Y + Y243F + W284D	120	107	78	126
W140F + R181H	113	130	122	115
N195F + V206Y + E260R + G273D	94	104	104	95
N195F + V206Y + Y243F + E260K + G273D	102	137	91	125
D134E + G476E	120	137	108	120
K72R + N195F + V206Y + Y243F + E260H + G273V	120	132	118	152
N195F + V206Y + Y243F + E260N + G273V	97	123	107	102
W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G	107	149	119	111
N195F + V206Y + Y243F + E260K + W284D	136	209	107	116
W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + W284D	144	111	107	101
W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260T + W284D	138	273	117	120
W189E + N195F + V206Y + Y243F	108	129	128	117
W140Y + N195F + V206Y + Y243F + W284D	147	254	112	123
N195F + V206Y + Y243F + G477R	110	108	110	123
N195F + V206Y + Y243F + G477M	105	110	105	104
W140Y + W189G + N195F + V206Y + Y243F + E260G	124	132	103	113
W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G +	122	313	113	103



G477E				
W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + G476E	125	114	117	108
W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + S303G	113	112	114	110
W140Y + W189T + N195F + V206Y + Y243F + E260G	119	112	123	111
W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + G337N	110	109	119	113
Y100I + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G	128	110	140	109
G109A + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G	115	245	129	116
W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R	124	160	142	125
G109A+W140Y+E194D+N195F+V206Y+Y243F+E260G	108	222	117	123
G109A+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+ G476E	126	188	125	122
T51I+Y100I+G109A+W140Y+N195F+V206Y+ Y243F+ E260G	113	175	128	110
T51I+G109A+W140Y+N195F+V206Y +Y243F+E260G+ W439R	119	147	127	125
T51I+ S52Q+ N54K+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E	129	259	126	113
W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G304R+ G476K	124	179	135	125
W140Y+ N195F+ V206Y+243F+E260G+W284R+G477K	132	309	144	124
W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+W284F+ G477R	134	298	140	116
N195F+V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D	115	102	101	107
N195F+ V206Y +Y243F +S473T+ G476R	101	95	113	100
N195F+ V206Y+ Y243F+ G476E	100	118	100	94

Los resultados del ensayo de la capacidad limpiadora demuestran claramente que las capacidades de las variantes mejoran con respecto a su correspondiente molécula precursora (SEC ID N. ° 7) a las temperaturas analizadas.

5 Ejemplo 2

Evaluación del comportamiento a gran escala en lavadora de ropa de las variantes de amilasa en detergentes líquidos.

10 I. Preparación de las composiciones de ensayo de detergente

En este experimento, se prepararon cuatro composiciones de ensayo basadas en la Formulación 2A de detergente líquido. Se preparó una base de detergente a partir de la Formulación 2A que no contenía enzimas y un pH final de pH 8,2.

15 Ejemplo 20 Composición detergente para lavado de ropa líquido de limpieza intensiva

Formulación 2A	(% peso)
Alquilbencenosulfonato sódico	10,2
Ácido cítrico	3,14
Ácido graso C <sub>12-18</sub>	2,59
Alquiletoxi 3 sulfato sódico	1,17
Etoxilado 1,5 de 7 alquilo C <sub>12-18</sub>	6,32
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(CH <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )-bis((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	0,63
Copolímero injertado al azar <sup>1</sup>	1,07
Quelante de tipo fosfonato	0,41
Abrillantador	0,09

Hidrótopo	0,93
Componentes minoritarios: tintes, perfumes, enzimas, estabilizadores de enzimas, disolventes, estructurantes, modificadores del pH	Resto

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

Se prepararon las siguientes siete composiciones detergentes:

Formulación detergente 2A	
Ejemplo comparativo A	Sin enzima
Ejemplo comparativo B	Adición de *0,23 ppm <sup>1</sup> Natalase®
Ejemplo C según la invención	Adición de *0,23 ppm <sup>2</sup> de la variante 3 de amilasa de la presente invención
Ejemplo D según la invención	Adición de *0,23 ppm <sup>3</sup> de la variante 4 de amilasa de la presente invención
Ejemplo E según la invención	Adición de *0,23 ppm <sup>4</sup> de la variante 5 de amilasa de la presente invención
Ejemplo F según la invención	Adición de *0,23 ppm <sup>5</sup> de la variante 6 de amilasa de la presente invención
Ejemplo G según la invención	Adición de *0,23 ppm <sup>6</sup> de la variante 7 de amilasa de la presente invención

\* Añadido como proteína enzimática activa

- 1 Natalase® es una enzima amilasa suministrada por Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca como 'Natalase 200 L'.
- 2 La variante 3 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones G109A, W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G y G476E. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + G109A + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + G476E.
- 3 La variante 4 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones T51I, G109A, W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G y W439R. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + T51I + G109A + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + W439R.
- 4 La variante 5 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones T51I, S52Q, N54K, G109A, W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G y G476E. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + T51I + S52Q + N54K + G109A + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + G476E.
- 5 La variante 6 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G, G304R y G476K. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + G304R + G476K.
- 6 La variante 7 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G, W284R y G477K. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + W284R + G477K.

## II. Telas de ensayo

Tres manchas sensibles a amilasa; PCS-28 Rice Starch, CS-128 Aged Rice Starch y CS-26 Corn Starch, 5 cm x 5 cm (suministradas por el Centre For Test materials, Países Bajos) se unieron a un tejido de algodón blanco tricotado de 20 cm x 20 cm (suministrado por Warwick Equest, Durham, Reino Unido). Dos manchas sensibles a amilasa; Chilli Con Carne y Spaghetti Heinz, 2,5 cm de diámetro se unieron a un tejido de algodón blanco tricotado de 20 cm x 20 cm (suministrado por Warwick Equest, Durham, Reino Unido). Se usaron ocho réplicas (2 réplicas para 4 máquinas diferentes) para cada formulación de ensayo.

Materiales de ensayo	PCS-28 Rice Starch, CS-128 Aged Rice Starch, CS-26 Corn Starch, Chilli Con Carne y Spaghetti Heinz.
Balasto de suciedad	Pudding de arroz con pera y manzana, Grandma's Sunday Lunch, sopa de tomate, salsa de spaghetti a la boloñesa, salsa agridulce, alimento infantil de zanahoria y patata, salsa de carne Bisto, salsa de carne ASDA, salsa de carne para pasta ASDA, salsa barbacoa, salsa curry, batido de chocolate Frijj, sopa de puerro y patata, sirope de

	chocolate Hershey (todos suministrados por Warwick Equest, Durham, Reino Unido). CS-28 Rice Starch, PS-28 Rice Starch, CS-29 Tapioca Starch (todos suministrados por el Centre For Testmaterials, Países Bajos).
Balasto limpio	2,5 kg de una mezcla 50:50 de toallitas y hojas de algodón

III. Procedimiento del ensayo de lavado

5 El método implica el uso de lavadoras de ropa Western Europe Hotpoint, modelo Aquarius WF541. Se usaron formulaciones de ensayo como se ha descrito anteriormente para lavar las manchas sensibles a amilasa mediante la adición de una carga mixta de suciedad y balasto como se ha descrito anteriormente.

10 Lavadoras de ropa que contenían 6 g/l de formulación de ensayo, 13 l de agua a 10° dureza clark, junto con telas de ensayo y balasto se lavaron a 15 °C con un ciclo rápido de lavado para algodón con una duración de 1 hora y 15 minutos. Tras el lavado, los tejidos se tendieron en el interior.

El proceso de lavado se repitió en 3 ciclos de lavado más.

15 El índice de eliminación de manchas (SRI) (medido comparando los valores de L\* a\* b\* entre el tejido lavado y sin lavar) se midió a continuación para cuantificar la capacidad de eliminación de manchas de las composiciones detergentes.

20 El índice de capacidad también se midió calculando (comportamiento en el Ejemplo C, D, E, F o G menos el comportamiento del ejemplo comparativo A) dividido por (comportamiento del ejemplo comparativo B menos el comportamiento del ejemplo comparativo A) multiplicado por 100.

IV. Comparación de las muestras.

Tabla 1: SRI promedio para 5 muestras (8 réplicas de cada mancha)

Ejemplo	SRI promedio SRI (%) (LSD asociado)	SRI promedio versus A	SRI promedio versus B
Ejemplo comparativo A	<b>33,2</b> (3,7)	--	--
Ejemplo comparativo B	<b>55,2</b> (3,7)	22,0	--
Ejemplo C según la invención	<b>66,1</b> (3,7)	32,9	10,9
Ejemplo D según la invención	<b>64,0</b> (3,7)	30,8	8,8
Ejemplo E según la invención	<b>66,8</b> (3,7)	33,6	11,6
Ejemplo F según la invención	<b>64,6</b> (3,7)	31,4	9,4
Ejemplo G según la invención	<b>67,8</b> (3,7)	34,6	12,6

25

Tabla 2: Índice de comportamiento para Chilli Con Carne (8 réplicas)

Ejemplo	Índice de comportamiento
Ejemplo comparativo A	--
Ejemplo comparativo B	100
Ejemplo C según la invención	169
Ejemplo D según la invención	145
Ejemplo E según la invención	181
Ejemplo F según la invención	178
Ejemplo G según la invención	188

30 Al comparar las muestras lavadas con la composición del ejemplo A (sin enzima presente) con el ejemplo B (que contiene Natalasa), C, D, E, F y G (que contienen las variantes 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente), es evidente que la capacidad de eliminación de manchas se ve mejorada por la adición de una enzima amilasa.

35 Al comparar las muestras lavadas con la composición del ejemplo B (que contiene Natalasa) con los ejemplos C, D, E, F y G (que contienen las variantes 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente) según el ejemplo A como referencia (sin enzima), es evidente que las variantes 3, 4, 5, 6 y 7 de la invención son capaces de conseguir niveles significativamente mayores de eliminación de manchas que Natalase®.

Ejemplo 3

40 Evaluación del comportamiento a gran escala en lavadora de ropa de las variantes de amilasa en detergentes líquidos.

I. Preparación de las composiciones de ensayo de detergente

En este experimento, se prepararon cuatro composiciones de ensayo basadas en la Formulación 3A de detergente líquido. Se preparó una base de detergente a partir de la Formulación 3A que no contenía enzimas y un pH final de pH 8,2.

5

Formulación 3A Composición detergente para lavado de ropa líquido de limpieza intensiva

Formulación 3A	(% peso)
Alquiletoxi 1,8 sulfato sódico	14,81
Alquilbencenosulfonato sódico	3,53
Alquilsulfato ramificado	2,44
Alquil C <sub>12-18</sub> 1,5-9-etoxilato	0,88
Óxido de dimetilamina C <sub>12</sub>	0,56
Ácido cítrico	2,05
Ácido graso C <sub>12-18</sub>	1,48
Polietilenimina etoxilada <sup>2</sup>	1,51
Quelante de tipo fosfonato	0,53
Abrillantador	0,19
Polímero anfifílico alcoxilado <sup>3</sup>	1,25
Componentes minoritarios: tintes, perfumes, enzimas, estabilizadores de enzimas, disolventes, estructurantes, modificadores del pH	Resto

<sup>2</sup> Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

<sup>3</sup> El polímero anfifílico alcoxilado es una polietileneimina (PM 600), preparado a partir de un polímero que se ha derivatizado para contener 24 grupos etoxilados por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH.

10

Se prepararon las seis siguientes formulaciones:

Formulación 3A	
Ejemplo comparativo A	Sin enzima
Ejemplo comparativo B	Adición de *0,1 ppm <sup>1</sup> Natalase®
Ejemplo C según la invención	Adición de *0,1 ppm <sup>2</sup> de la variante 5 de amilasa de la presente invención
Ejemplo D según la invención	Adición de *0,1 ppm <sup>3</sup> de la variante 6 de amilasa de la presente invención
Ejemplo E según la invención	Adición de *0,1 ppm <sup>4</sup> de la variante 7 de amilasa de la presente invención
Ejemplo F según la invención	Adición de *0,1 ppm <sup>5</sup> de la variante 8 de amilasa de la presente invención

\* Añadido como proteína enzimática activa

<sup>1</sup> Natalase® suministrada por Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca como 'Natalase 200 L'.

<sup>2</sup> La variante 5 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones T51I, S52Q, N54K, G109A, W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G y G476E. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + T51I + S52Q + N54K + G109A + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + G476E.

<sup>3</sup> La variante 6 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G, G304R y G476K. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + G304R + G476K.

<sup>4</sup> La variante 7 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G, W284R y G477K. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + W284R + G477K.

<sup>5</sup> La variante 8 es una amilasa variante de la presente invención del tipo de la amilasa natural de *Bacillus* sp722 SEC ID N.º 1 con las siguientes dos deleciones D183\* + G184\* e incluidas las sustituciones W140Y, N195F, V206Y, Y243F, E260G, W284F y G477R. También citada como SP722 + D183\* + G184\* + W140Y + N195F + V206Y + Y243F + E260G + W284F + G477R.

30

II. Telas de ensayo

<sup>35</sup> Tres machas sensibles a amilasa; PCS-28 Rice Starch, PS-28 Rice Starch y CS-29 Tapioca Starch, 5 cm x 5 cm (suministradas por el Centre For Test materials, Países Bajos) se unieron a un tejido de algodón blanco tricotado de 20 cm x 20 cm (suministrado por Warwick Equest, Durham, Reino Unido). Una mancha sensible a amilasa; Spaghetti

Heinz, 2,5 cm de diámetro se unió a un tejido de algodón blanco tricotado de 20 cm x 20 cm (suministrado por Warwick Equest, Durham, Reino Unido). Una mancha sensible a amilasa; Salsa de carne, 2,5 cm de diámetro se unió a un tejido de algodón blanco tricotado de 25 cm x 24 cm (suministrado por Accurate Product Development, Fairfield, Ohio, EE. UU.). Se usaron ocho réplicas (2 réplicas para 4 máquinas diferentes) para cada formulación de ensayo.

5

Materiales de ensayo	PCS-28 Rice Starch, PS-28 Rice Starch, CS-29 Tapioca Starch, Spaghetti Heinz y salsa de carne.
Balasto de suciedad	Salsa barbacoa, salsa de carne Bisto, comida infantil de pudín de chocolate, salsa de chocolate Hershey, sopa de tomate, Chilli Con Carne, salsa de espaguetis a la boloñesa (todos suministrados por Warwick Equest, Durham, Reino Unido). Zumo de uva, mostaza, café, arándano azul, salsa barbacoa, sangre, grasa, mantequilla quemada, grasa de tocino, doble sirope de chocolate, arcilla de Estados Unidos, maquillaje, vino, té y spaghetti (todos suministrados por APD, Fairfield, Ohio, Estados Unidos). CS-28 Rice Starch, CS-128 Aged Rice Starch, CS-26 Corn Starch (todos suministrados por el Centre For Testmaterials, Países Bajos).
Balasto limpio	6 x camisetas de algodón, 6 x fundas de almohada de algodón, 6 x toallas de manos

### III. Procedimiento del ensayo de lavado

10 El método implica el uso de una lavadora de ropa estadounidense Kenmore modelo 600 series. Se usaron formulaciones de ensayo como se ha descrito anteriormente para lavar las manchas sensibles a amilasa mediante la adición de una carga mixta de suciedad y balasto como se ha descrito anteriormente.

15 Lavadoras de ropa que contenían 0,78 g/l de formulación de ensayo, 64 l de agua a 6° dureza clark, junto con telas de ensayo y balasto se lavaron a 15 °C en un ciclo de lavado super rápido de 12 minutos con un aclarado. Tras el lavado, los tejidos se tendieron en el interior. El proceso de lavado se repitió en 3 ciclos de lavado más.

20 El índice de eliminación de manchas (medido comparando los valores de L\* a\* b\* entre el tejido lavado y sin lavar) se midió a continuación para cuantificar la capacidad de eliminación de manchas de las composiciones detergentes. El índice de capacidad también se midió calculando (comportamiento en el Ejemplo C, D, E, o F menos el comportamiento del ejemplo comparativo A) dividido por (comportamiento del ejemplo comparativo B menos el comportamiento del ejemplo comparativo A) multiplicado por 100.

### IV. Comparación de las muestras.

25 Tabla 1: SRI promedio para 5 muestras (8 réplicas de cada mancha)

Ejemplo	SRI promedio SRI (%) (LSD asociado)	SRI promedio versus A	SRI promedio versus B
Ejemplo comparativo A	<b>39,5</b> (4,8)	--	--
Ejemplo comparativo B	<b>51,4</b> (4,8)	11,9	--
Ejemplo C según la invención	<b>69,4</b> (4,8)	29,9	18,0
Ejemplo D según la invención	<b>64,7</b> (4,8)	25,2	13,3
Ejemplo E según la invención	<b>71,3</b> (4,8)	31,8	19,9
Ejemplo F según la invención	<b>69,2</b> (4,8)	29,7	17,8

Tabla 2: Índice de comportamiento para spaghetti Heinz (8 réplicas)

Ejemplo	Índice de comportamiento
Ejemplo comparativo A	--
Ejemplo comparativo B	100
Ejemplo C según la invención	266
Ejemplo D según la invención	256
Ejemplo E según la invención	284
Ejemplo F según la invención	416

30 Al comparar las muestras lavadas con la composición del ejemplo A (sin enzima presente) con el ejemplo B (que contiene Natalasa), C, D, E, y F (que contienen las variantes 5, 6, 7, y 8 respectivamente), es evidente que la capacidad de eliminación de manchas se ve mejorada por la adición de una enzima amilasa.

35 Al comparar las muestras lavadas con la composición del ejemplo B (que contiene Natalasa) con los ejemplos C, D, E, y F (que contienen las variantes 5, 6, 7 y 8 respectivamente) según el ejemplo A como referencia (sin

enzima), es evidente que las variantes 5, 6, 7 y 8 de la invención son capaces de conseguir niveles significativamente mayores de eliminación de manchas que Natalase®.

Método de uso

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

En la presente memoria, el lavado incluye, pero no se limita a, restregado y agitación mecánica. El secado de dichas superficies o tejidos se puede llevar a cabo mediante uno de cualquiera de los medios habituales utilizados tanto en el campo doméstico como en el industrial. Dichos medios incluyen, aunque no de forma limitativa, secado con aire forzado o aire en reposo a temperaturas ambiente o elevadas a presiones entre 0,5 y 0,001 MPa (entre 5 y 0,01 atmósferas) en presencia o ausencia de radiación electromagnética, incluida la luz solar, irradiación infrarroja, ultravioleta y de microondas. En un aspecto, dicho secado se puede llevar a cabo a temperaturas mayores que la temperatura ambiente con una plancha en donde, por ejemplo, dicho tejido puede estar en contacto directo con dicha plancha por periodos cortos o incluso prolongados y en donde la presión se puede ejercer más allá de lo que estaría normalmente presente debido a la fuerza de la gravedad. En otro aspecto, dicho secado se puede llevar a cabo a temperaturas superiores a la ambiente empleando una secadora. Los aparatos para secar tejidos son bien conocidos, y frecuentemente se denominan como secadora de ropa. Además de las prendas de vestir, dichos aparatos se utilizan para secar otros muchos objetos incluidos toallas, sábanas, fundas de almohada, pañales y así sucesivamente y este equipo se ha aceptado como una comodidad de uso habitual en muchas naciones del mundo, sustituyendo esencialmente el uso de tendederos para secar tejidos. La mayoría de las secadoras que se utilizan en la actualidad utilizan aire caliente que se hace pasar sobre y por el tejido a medida que gira en el interior de la secadora. El aire se puede calentar, por ejemplo, bien electrónicamente, con una llama de gas, o incluso mediante radiación de microondas. Dicho aire se puede calentar de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 400 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 200 °C, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 100 °C, o incluso de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 85 °C y usarse en la secadora para secar la superficie y/o el tejido. Como apreciará el experto en la técnica, las composiciones limpiadoras de la presente invención resultan adecuadas de forma ideal para usar en aplicaciones de lavado de ropa. Por tanto, la presente invención incluye un método para lavar un tejido. El método comprende las etapas de poner en contacto un tejido que se va a lavar con una dicha solución limpiadora para lavado de ropa que comprende al menos una realización de composición limpiadora de los solicitantes, aditivo de limpieza o mezcla de los mismos. El tejido puede comprender la mayoría de los tejidos capaces de ser lavados en condiciones normales de uso por parte del consumidor o en instituciones públicas. La solución tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 10,5. Las composiciones pueden emplearse de forma típica a concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15.000 ppm, en solución. Las temperaturas del agua, típicamente, están comprendidas en el intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 90 °C. La relación de agua a tejido es, preferiblemente, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

Ejemplos de detergentes

Ejemplos 1-6

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

	1 (% en peso)	2 (% en peso)	3 (% en peso)	4 (% en peso)	5 (% en peso)	6 (% en peso)
Alquilbencenosulfonato lineal	20	22	20	15	20	20
Cloruro de dimetilhidroxietilamonio C <sub>12-14</sub>	0,7	0,2	1	0,6	0,0	0
AE3S	0,9	1	0,9	0,0	0,5	0,9
AE7	0,0	0,0	0,0	1	0,0	3
Tripolifosfato de sodio	5	0,0	4	9	2	0,0
Zeolita A	0,0	1	0,0	1	4	1
Silicato 1,6R (SiO <sub>2</sub> :Na <sub>2</sub> O en una relación 1,6:1)	7	5	2	3	3	5
Carbonato de sodio	25	20	25	17	18	19
Poliacrilato PM 4500	1	0,6	1	1	1,5	1
Copolímero de injerto aleatorio <sup>1</sup>	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Carboximetilcelulosa	1	0,3	1	1	1	1
Proteasa (Savinase®, 32,89 mg de sustancia activa/g)	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1

ES 2 608 964 T3

Lipasa - Lipex® (18 mg de sustancia activa/g)	0,03	0,07	0,3	0,1	0,07	0,4
*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	0,63	1,0	2,0	0,44	0,88	0,3
Abrillantador fluorescente 1	0,06	0,0	0,06	0,18	0,06	0,06
Abrillantador fluorescente 2	0,1	0,06	0,1	0,0	0,1	0,1
DTPA	0,6	0,8	0,6	0,25	0,6	0,6
MgSO <sub>4</sub>	1	1	1	0,5	1	1
Percarbonato de sodio	0,0	5,2	0,1	0,0	0,0	0,0
Perborato de sodio monohidratado	4,4	0,0	3,85	2,09	0,78	3,63
NOBS	1,9	0,0	1,66	0,0	0,33	0,75
TAED	0,58	1,2	0,51	0,0	0,015	0,28
Ftalocianina de cinc sulfonada	0,0030	0,0	0,0012	0,0030	0,0021	0,0
S-ACMC	0,1	0,0	0,0	0,0	0,06	0,0
Direct Violet 9	0,0	0,0	0,0003	0,0005	0,0003	0,0
Acid Blue 29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0003
Sulfato/humedad	Resto					

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

Ejemplos 7-12

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

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

ES 2 608 964 T3

activa)						
S-ACMC	0,01	0,01	0	0,01	0	0
Direct Violet 9 (sustancia activa)	0	0	0,0001	0,0001	0	0
Sulfato/Agua & Otras sustancias	Resto					

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

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

	13 (% peso)	14 (% peso)	15 (% peso)	16 (% peso)	17 (% peso)	18 (% peso)
Alquil C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> sulfato etoxilado (1,8)	14,7	11,6		16,31		17,29
Alquilbencenosulfonato C <sub>11,8</sub>	4,3	11,6	8,3	7,73	11,7	7,73
Alquilsulfato C <sub>16-17</sub> ramificado	1,7	1,29		3,09		3,3
Etoxilato-9 de alquilo C <sub>12-14</sub>	0,9	1,07		1,31		1,31
Óxido de dimetilamina C <sub>12</sub>	0,6	0,64		1,03		1,03
Ácido cítrico	3,5	0,65	3	0,66	2,27	0,67
Ácido graso C <sub>12-18</sub>	1,5	2,32	3,6	1,52	0,82	1,52
Borato sódico (Bórax)	2,5	2,46	1,2	2,53		2,53
Alquil C <sub>12-14</sub> etoxi 3 sulfato sódico			2,9		3,9	
alquil C <sub>14-15</sub> 7-etoxilato			4,2		1,9	
Alquil C <sub>12-14</sub> -7-etoxilato			1,7		0,5	
Cloruro de Ca dihidratado					0,045	
Formiato de Ca	0,09	0,09		0,09		0,09
Un compuesto: bis((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(CH <sub>3</sub> -N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )-bis((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ); n es de 20 a 30; x es de 3 a 8, opcionalmente sulfatado o sulfonado			1,2		0,66	
Copolímero injertado al azar <sup>1</sup>		1,46	0,5		0,83	
Polietilenimina etoxilada <sup>2</sup>	1,5	1,29		1,44		1,44
Ácido dietilentriamino pentaacético	0,34	0,64		0,34		0,34
Ácido dietilentriaminapentametilenfosfónico			0,3		0,3	
Ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico					0,18	
Hidrato de la sal disódica del ácido dihidroxibenceno-3,5-disulfónico						0,19
Tinopal AMS-GX		0,06				0,29
Tinopal CBS-X	0,2	0,17		0,29		
Tinopal TAS-X B36					0,091	
Polímero anfifílico alcoxilado para limpiar grasa <sup>3</sup>	1,28	1	0,4	1,93		1,93
Etanol	2	1,58	1,6	5,4	1,2	3,57
Propilenglicol	3,9	3,59	1,3	4,3		3,8
Dietilenglicol	1,05	1,54		1,15		1,15
Polietilenglicol	0,06	0,04		0,1		0,1
*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	15,0	10,0	5,0	8,0	4,25	11,7
Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4	1,26	0,31	1,13
NaOH	2,44	1,8		3,01	3,84	0,24
Sulfonato de cumeno sódico			1		0,95	
Formiato sódico		0,11		0,09	0,2	0,12
Agua, componentes estéticos (Tintes, perfumes) y componentes minoritarios (enzimas, disolventes, estructurantes)	Resto					

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



- 2 Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.  
 3 El polímero limpiador de grasa anfifílico alcoxilado es una polietilenimina (PM = 600) con 24 grupos etoxilados por -NH y 16 grupos propoxilados por -NH  
 \* La amilasa de la presente invención se muestra como mg de sustancia activa enzimática por 100 g de detergente.

5

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

	19 (% peso)	20 (% peso)	21 (% peso)
Alquilbencenosulfonato sódico	21,0	10,2	3,53
Alquil C <sub>12-18</sub> 1,5-9-etoxilato	18,0	6,32	0,88
Alquilsulfato ramificado			2,44
Alquiletoxi 1-3 sulfato sódico		1,17	14,81
Ácido cítrico		3,14	2,05
Óxido de dimetilamina C <sub>12</sub>			0,56
Ácido graso C <sub>12-18</sub>	15,0	2,59	1,48
Proteasa (Purafect Prime®, 40,6 mg de sustancia activa/g)	1,5	0,52	1,64
Mananasa (Mannaway®, 11 mg de sustancia activa/g)	0,1	0,06	
Xiloglucanasa (Whitezyme®, 20 mg de sustancia activa/g)	0,2	0,06	
*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	5,9	2,3	12,8
bis((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(CH <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )-bis((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o opcionalmente sulfatado o sulfonado	2,0	0,63	
Copolímero injertado al azar <sup>1</sup>		1,07	
Polietilenimina etoxilada <sup>2</sup>	0,8		1,51
Polímero anfifílico alcoxilado <sup>3</sup>			
Quelante de tipo fosfonato	0,8	0,41	0,53
Hidrótoto		0,93	
Abrillantador	0,2	0,09	0,19
Tinte mordiente de tiofeno etoxilado	0,004		
Componentes minoritarios: tintes, perfume, microcápsulas de perfume, enzimas, estabilizadores de enzimas, disolventes, estructurantes, agentes modificadores del pH	Resto	Resto	Resto

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

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

- 10 1 El copolímero de injerto al azar es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.
- 15 2 Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.  
 3 El polímero anfifílico alcoxilado es una polietileneimina (PM 600), preparado a partir de un polímero que se ha derivatizado para contener 24 grupos etoxilados por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH.

Materias primas y notas para los Ejemplos de composiciones 1-21

- 20 Alquilbencenosulfonato lineal que tiene una longitud promedio de cadena de carbono alifático de C<sub>11</sub>-C<sub>18</sub>  
 Cloruro de dimetilhidroxietilamonio C<sub>12-18</sub>  
 AE3S es alquil C<sub>12-15</sub> etoxi (3) sulfato  
 AE7 es alcohol etoxilado C<sub>12-15</sub>, con un grado promedio de etoxilación de 7  
 25 AE9 es alcohol etoxilado C<sub>12-16</sub>, con un grado promedio de etoxilación de 9  
 HSAS es un alquilsulfato primario de ramificación intermedia con una longitud de cadena de carbono de aproximadamente 16-17 según se describe en US-6.020.303 y US-6.060.443  
 El poliácido PM 4500 es comercializado por BASF  
 La carboximetilcelulosa es Finnfix® V, comercializada por CPKelco, Arnhem, Países Bajos  
 30 Los quelantes de fosfonato son, por ejemplo, ácido dietilentetraaminapentaacético (DTPA) hidroxietano difosfonato (HEDP)  
 Savinase®, Natalase®, Stainzyme®, Lipex®, Celluclean™, Mannaway® y Whitezyme® son todos productos de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.  
 Purafect®, Purafect Prime® son productos de Genencor International, Palo Alto, California, EE. UU.

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

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

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

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

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

HSAS es alquilsulfato de ramificación intermedia

10 El Ligitint® Violet CT se comercializa por Milliken, Spartanburg, South Carolina, EE. UU.)

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

	22 (% peso)	23 (% peso)	24 (% peso)	25 (% peso)	26 (% peso)
Ácido alquibenceno sulfónico	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
alquil C <sub>12-18</sub> etoxi 3 sulfato	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
alquil C <sub>12-18</sub> 7-etoxilato	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0
Ácido cítrico	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Ácido graso	14,8	14,8	14,8	14,8	14,8
*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	6	12	8	2	10
Polietilenimina etoxilada <sup>1</sup>	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Proteasa (Purafect Prime®, 40,6 mg de sustancia activa/g)	1,4	2,0	0,9	1,2	0
Ácido hidroxietano difosfónico	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Abrillantador	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
P-diol	15,8	13,8	13,8	13,8	13,8
Glicerol	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
MEA	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
TIPA	-	-	2,0	-	-
TEA	-	2,0	-	-	-
Sulfonato de cumeno	-	-	-	-	2,0
ciclohexildimetanol	-	-	-	2,0	-
Agua	10	10	10	10	10
Estructurante	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
Perfume	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Tampones (monoetanolamina)	Hasta pH 8,0				
Disolventes (1,2-propanodiol, etanol)	hasta 100%				

15 \* La amilasa de la presente invención se muestra como mg de sustancia activa enzimática por 100 g de detergente.

<sup>1</sup> Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

Ejemplo 27 Composición en dosis unitaria multicompartimental

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

Composición base 1	27 (% peso)
Glicerol (min 99)	5,3
1,2-propanodiol	10,0
Ácido cítrico	0,5
Monoetanolamina	10,0
Sosa cáustica	-
Dequest 2010	1,1
Sulfito potásico	0,2
*Amilasa de la presente invención (mg de sustancia activa)	8,0

## ES 2 608 964 T3

Marlipal no iónico C24EO7	20,1
HLAS	24,6
Abrillantador óptico FWA49	0,2
Ácido graso C12-15	16,4
Lutensit Z96 polimérico	2,9
Polietilenimina etoxilada PEI600 E20	1,1
MgCl <sub>2</sub>	0,2
Disolventes (1,2-propanodiol, etanol)	hasta 100%

### Formulaciones multicompartimentales

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

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

5

Las dimensiones y valores divulgados en la presente memoria no deben entenderse como limitados estrictamente a los valores numéricos exactos citados. No obstante, a menos que esté especificado de otra manera, se pretende que cada una de tales dimensiones signifique tanto el valor citado como un intervalo funcionalmente equivalente alrededor de ese valor. Por ejemplo, una dimensión descrita como «de 40 mm» significa «de aproximadamente 40 mm».

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> The Procter & Gamble Company

5 <120> Composiciones limpiadoras que comprenden variantes de amilasa en referencia a un listado de secuencias

<130> CM3675FML

10 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 485

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 1

20 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
1 5 10 15

25 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser  
20 25 30

30 Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
35 40 45

35 Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
50 55 60

40 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
65 70 75 80

40 Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly  
85 90 95

45 Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
100 105 110

50 Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
115 120 125

55 Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
130 135 140

ES 2 608 964 T3

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 5  
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg  
 165 170 175  
 10 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 15 Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met  
 195 200 205  
 20 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr  
 210 215 220  
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 25 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala  
 245 250 255  
 30 Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 35 Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 40 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300  
 Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320  
 45 His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335  
 50 Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 55 Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365

ES 2 608 964 T3

5 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala  
370 375 380

10 Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr  
385 390 395 400

15 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
405 410 415

20 Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
420 425 430

25 Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile  
450 455 460

30 Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
465 470 475 480

35 Ile Trp Val Lys Arg  
485

40 <210> 2  
<211> 485  
<212> PRT  
<213> Bacillus sp.

45 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
1 5 10 15

50 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser  
20 25 30

55 Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
35 40 45

60 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
55 60

ES 2 608 964 T3

5 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
65 70 75 80

10 Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly  
85 90 95

15 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
100 105 110

20 Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
115 120 125

25 Gln Glu Val Thr Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Arg Phe Asp  
130 135 140

30 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
145 150 155 160

35 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Arg Leu Asn Asn Arg  
165 170 175

40 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly His Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
180 185 190

45 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met  
195 200 205

50 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
210 215 220

55 Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
225 230 235 240

Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala  
245 250 255

60 Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
260 265 270

65 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val

ES 2 608 964 T3

		275						280								285
5	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly
		290					295				300					
10	Gly	Asn	Tyr	Asp	Met	Arg	Asn	Ile	Phe	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Gln	Arg
	305					310					315					320
15	His	Pro	Ser	His	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Ser	Gln	Pro
					325					330					335	
20	Glu	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Phe	Val	Glu	Glu	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala
				340					345					350		
25	Tyr	Ala	Leu	Thr	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr
			355					360					365			
30	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ala	Met	Arg	Ser
		370					375					380				
35	Lys	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Lys
	385					390					395					400
40	Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asp	His	His	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu
					405					410					415	
45	Gly	Asn	Thr	Ala	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp
				420					425					430		
50	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Met	Phe	Val	Gly	Arg	Asn	Lys	Ala	Gly
			435					440					445			
55	Gln	Val	Trp	Ser	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Thr	Gly	Thr	Val	Thr	Ile
		450					455					460				
60	Asn	Ala	Asp	Gly	Trp	Gly	Asn	Phe	Ser	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser
	465					470					475					480
65	Ile	Trp	Val	Asn	Lys											
					485											



ES 2 608 964 T3

<210> 3  
 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus sp.  
 5  
 <400> 3  
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser  
 20  
 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly  
 85 90 95  
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg  
 165 170 175  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 55

ES 2 608 964 T3

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met  
 195 200 205

5 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220

10 Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240

15 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala  
 245 250 255

20 Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270

25 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285

30 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly  
 290 295 300

35 Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg  
 305 310 315 320

40 His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335

45 Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350

50 Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365

55 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser  
 370 375 380

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg  
 385 390 395 400

Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415

ES 2 608 964 T3

Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
420 425 430

5  
Gly Ala Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly  
435 440 445

10  
Gln Val Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala Gly Thr Val Thr Ile  
450 455 460

15  
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
465 470 475 480

Ile Trp Val Asn Lys  
485

20  
<210> 4  
<211> 485  
<212> PRT  
25 <213> Bacillus sp.  
<400> 4

30  
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
1 5 10 15

35  
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala  
20 25 30

40  
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
35 40 45

40  
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
50 55 60

45  
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
65 70 75 80

50  
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly  
85 90 95

55  
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
100 105 110

ES 2 608 964 T3

Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 5  
 Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 10 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 15 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys  
 165 170 175  
 20 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met  
 195 200 205  
 25 Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220  
 30 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 35 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr  
 245 250 255  
 40 Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 45 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300  
 50 Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320  
 55 His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335

ES 2 608 964 T3

5 Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 10 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser  
 370 375 380  
 15 Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr  
 385 390 395 400  
 20 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415  
 25 Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430  
 30 Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445  
 35 Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460  
 40 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480  
 Val Trp Val Lys Gln  
 485  
 <210> 5  
 <211> 485  
 45 <212> PRT  
 <213> Bacillus sp.  
 <400> 5  
 50 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
 1 5 10 15  
 55 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala  
 20 25 30

ES 2 608 964 T3

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

ES 2 608 964 T3

				245					250					255		
5	Thr	Gly	Lys	Pro	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu
				260					265					270		
10	Ala	Ala	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Trp	Asn	His	Ser	Val
			275					280					285			
15	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Asn	Ser	Gly
		290					295					300				
20	Gly	Tyr	Phe	Asp	Met	Arg	Asn	Ile	Leu	Asn	Gly	Ser	Val	Val	Gln	Lys
	305					310					315					320
25	His	Pro	Ile	His	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Ser	Gln	Pro
					325					330					335	
30	Gly	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Phe	Val	Gln	Ser	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala
				340					345					350		
35	Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr
			355					360					365			
40	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ser	Met	Lys	Ser
		370					375					380				
45	Lys	Ile	Asp	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Arg	Gln	Thr	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Thr
	385					390					395					400
50	Gln	His	Asp	Tyr	Phe	Asp	His	His	Asp	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu
					405					410					415	
55	Gly	Asp	Ser	Ser	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp
				420					425					430		
60	Gly	Pro	Gly	Gly	Asn	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Lys	His	Lys	Ala	Gly
			435					440					445			
65	Gln	Val	Trp	Arg	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Gly	Thr	Val	Thr	Ile
		450					455					460				

ES 2 608 964 T3

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Thr Val Asn Gly Gly Ala Val Ser  
 465 470 475 480

5 Val Trp Val Lys Gln  
 485

<210> 6  
 10 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus sp.

<400> 6  
 15 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15

20 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser  
 20 25 30

25 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45

Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 30

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80

35 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ala Leu Lys Ser Asn Gly  
 85 90 95

40 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110

45 Ala Thr Glu Trp Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn  
 115 120 125

Gln Glu Val Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 50

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 55



ES 2 608 964 T3

His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Arg  
 165 170 175  
 5 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 10 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met  
 195 200 205  
 15 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220  
 20 Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 25 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr  
 245 250 255  
 30 Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 35 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Ser Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 40 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Arg Ser Gly  
 290 295 300  
 45 Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg  
 305 310 315 320  
 50 His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335  
 55 Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Asp Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser  
 370 375 380

ES 2 608 964 T3

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys  
 385 390 395 400

5

Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Met Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415

10

Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430

15

Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445

20

Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460

25

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480

25

Ile Trp Val Asn Asn  
 485

30

<210> 7  
 <211> 483  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35

<220>  
 <223> Variante de la SEQ ID NO:1  
 <400> 7

40

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
 1 5 10 15

45

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser  
 20 25 30

50

Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45

55

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60

ES 2 608 964 T3

	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly
	65					70					75					80
5	Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	His	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gly
					85					90					95	
10	Val	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp
				100					105					110		
15	Ala	Thr	Glu	Asn	Val	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn
			115					120					125			
20	Gln	Glu	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp
		130					135					140				
25	Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr
	145					150					155					160
30	Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Ser	Glu
				180					185					190		
35	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Met	Asp	His
			195					200					205			
40	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Arg	Trp	Gly	Glu	Trp	Tyr	Thr	Asn
		210					215					220				
45	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys
	225					230					235					240
50	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Leu	Thr	His	Val	Arg	Asn	Ala	Thr	Gly
					245					250					255	
55	Lys	Glu	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala
				260					265					270		
60	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp
			275					280					285			

ES 2 608 964 T3

Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly Gly Asn  
 290 295 300

5 Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys His Pro  
 305 310 315 320

10 Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Gly Glu  
 325 330 335

15 Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350

20 Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365

Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala Lys Ile  
 370 375 380

25 Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400

30 Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asn  
 405 410 415

35 Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly Pro  
 420 425 430

40 Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly Gln Val  
 435 440 445

45 Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala  
 450 455 460

45 Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp  
 465 470 475 480

50 Val Lys Arg

<210> 8  
 55 <211> 483

ES 2 608 964 T3

<212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

5 <223> Variante de la SEQ ID NO:2

<400> 8

10	His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr
	1				5					10					15	
15	Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Asn	Ser	Asp	Ala	Ser
			20						25					30		
20	Asn	Leu	Lys	Ser	Lys	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Trp
			35					40					45			
25	Lys	Gly	Ala	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr
		50					55					60				
30	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly
	65					70					75					80
35	Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Asn	Asn	Gly
				85						90					95	
40	Ile	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp
				100					105					110		
45	Ala	Thr	Glu	Met	Val	Arg	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn
			115					120					125			
50	Gln	Glu	Val	Thr	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Arg	Phe	Asp
		130					135					140				
55	Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr
	145					150					155					160
50	His	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Gln	Ser	Arg	Arg	Leu	Asn	Asn	Arg
					165					170					175	
55	Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Thr	Glu
			180						185					190		

ES 2 608 964 T3

Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His  
 195 200 205  
 5  
 Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn  
 210 215 220  
 10 Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys  
 225 230 235 240  
 15 Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala Thr Gly  
 245 250 255  
 20 Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala  
 260 265 270  
 Ile Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp  
 275 280 285  
 25 Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly Gly Asn  
 290 295 300  
 30 Tyr Asp Met Arg Asn Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg His Pro  
 305 310 315 320  
 35 Ser His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Glu Glu  
 325 330 335  
 40 Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 45 Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Arg Ser Lys Ile  
 370 375 380  
 50 Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys Gln Asn  
 385 390 395 400  
 55 Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asn  
 405 410 415

ES 2 608 964 T3

Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly Ala  
 420 425 430  
 5  
 Gly Gly Ser Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly Gln Val  
 435 440 445  
 10  
 Trp Ser Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala  
 450 455 460  
 15  
 Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp  
 465 470 475 480  
 20  
 Val Asn Lys  
 <210> 9  
 <211> 483  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Variante de la SEQ ID NO:3  
 30 <400> 9  
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 35  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser  
 20 25 30  
 40  
 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 45  
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 50  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 55  
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly  
 85 90 95

ES 2 608 964 T3

Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
100 105 110

5  
Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
115 120 125

10  
Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
130 135 140

15  
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
145 150 155 160

20  
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg  
165 170 175

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu  
180 185 190

25  
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His  
195 200 205

30  
Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn  
210 215 220

35  
Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys  
225 230 235 240

40  
Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala Thr Gly  
245 250 255

Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala  
260 265 270

45  
Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp  
275 280 285

50  
Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly Gly Asn  
290 295 300

55  
Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg His Pro  
305 310 315 320



ES 2 608 964 T3

5 Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Glu Glu  
 325 330 335  
 Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 10 Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 15 Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380  
 20 Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg Gln Asn  
 385 390 395 400  
 25 Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asn  
 405 410 415  
 Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly Ala  
 420 425 430  
 30 Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly Gln Val  
 435 440 445  
 35 Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala  
 450 455 460  
 40 Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp  
 465 470 475 480  
 Val Asn Lys  
 45  
 <210> 10  
 <211> 483  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Variante de la SEQ ID NO:4  
 55 <400> 10

ES 2 608 964 T3

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 5  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala  
 20 25 30  
 10  
 Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 15  
 Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 20  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 25  
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly  
 85 90 95  
 30  
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 35  
 Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 40  
 Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 45  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 50  
 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys  
 165 170 175  
 55  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu  
 180 185 190  
 60  
 Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met Asp His  
 195 200 205  
 65  
 Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn  
 210 215 220

ES 2 608 964 T3

5 Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys  
 225 230 235 240

10 Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr Thr Gly  
 245 250 255

15 Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala  
 260 265 270

20 Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val Phe Asp  
 275 280 285

25 Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly Gly Tyr  
 290 295 300

30 Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys His Pro  
 305 310 315 320

35 Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Gly Glu  
 325 330 335

40 Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350

45 Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365

50 Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380

55 Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400

50 Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asn  
 405 410 415

55 Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly Pro  
 420 425 430

60 Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly Gln Val

# ES 2 608 964 T3

	435	440	445														
5	Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala 450 455 460																
10	Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp 465 470 475 480																
	Val Lys Gln																
15	<210> 11 <211> 483 <212> PRT <213> Artificial																
20	<220> <223> Variante de la SEQ ID NO:5																
25	<400> 11																
	His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His 1 5 10 15																
30	Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala 20 25 30																
35	Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp 35 40 45																
40	Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr 50 55 60																
45	Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly 65 70 75 80																
50	Thr Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly 85 90 95																
55	Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp 100 105 110																
	Gly Thr Glu Met Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn 115 120 125																

ES 2 608 964 T3

5 Gln Glu Ile Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 10 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys  
 165 170 175  
 15 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Ile Glu  
 180 185 190  
 20 Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His  
 195 200 205  
 25 Pro Glu Val Ile Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn  
 210 215 220  
 Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys  
 225 230 235 240  
 30 Tyr Ser Tyr Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr Thr Gly  
 245 250 255  
 35 Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Ala Ala  
 260 265 270  
 40 Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val Phe Asp  
 275 280 285  
 Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly Gly Tyr  
 290 295 300  
 45 Phe Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys His Pro  
 305 310 315 320  
 50 Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Gly Glu  
 325 330 335  
 55 Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala

ES 2 608 964 T3

			340					345						350		
5	Leu	Ile	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp
			355					360					365			
10	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ser	Met	Lys	Ser	Lys	Ile
		370					375					380				
15	Asp	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Arg	Gln	Thr	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Thr	Gln	His
	385					390					395					400
20	Asp	Tyr	Phe	Asp	His	His	Asp	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Asp
					405					410					415	
25	Ser	Ser	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp	Gly	Pro
				420					425					430		
30	Gly	Gly	Asn	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Lys	His	Lys	Ala	Gly	Gln	Val
			435					440					445			
35	Trp	Arg	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	Ala
		450					455					460				
40	Asp	Gly	Trp	Gly	Asn	Phe	Thr	Val	Asn	Gly	Gly	Ala	Val	Ser	Val	Trp
	465					470					475					480
45	Val	Lys	Gln													
50	<210>	12														
	<211>	483														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
55	<220>															
	<223>	Variante de la SEQ ID NO:6														
	<400>	12														
50	His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr
	1				5					10					15	
55	Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser
			20						25					30		

ES 2 608 964 T3

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

ES 2 608 964 T3

				245					250					255		
5	Lys	Asn	Met	Phe 260	Ala	Val	Ala	Glu	Phe 265	Trp	Lys	Asn	Asp	Ile 270	Gly	Ala
10	Ile	Glu	Asn 275	Tyr	Leu	Ser	Lys	Thr 280	Asn	Trp	Asn	His	Ser 285	Val	Phe	Asp
15	Val	Pro 290	Leu	His	Tyr	Asn	Leu 295	Tyr	Asn	Ala	Ser	Arg 300	Ser	Gly	Gly	Asn
20	Tyr 305	Asp	Met	Arg	Gln	Ile 310	Phe	Asn	Gly	Thr	Val 315	Val	Gln	Arg	His	Pro 320
25	Thr	His	Ala	Val	Thr 325	Phe	Val	Asp	Asn	His 330	Asp	Ser	Gln	Pro	Glu 335	Glu
30	Ala	Leu	Glu	Ser 340	Phe	Val	Glu	Glu	Trp 345	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala 350	Tyr	Ala
35	Leu	Thr	Leu 355	Thr	Arg	Asp	Gln	Gly 360	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe 365	Tyr	Gly	Asp
40	Tyr 370	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His 375	Gly	Val	Pro	Ala	Met 380	Lys	Ser	Lys	Ile
45	Asp 385	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala 390	Arg	Gln	Lys	Tyr 395	Ala	Tyr	Gly	Lys	Gln	Asn 400
50	Asp	Tyr	Leu	Asp	His 405	His	Asn	Met	Ile	Gly 410	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly 415	Asn
55	Thr	Ala	His	Pro 420	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala 425	Thr	Ile	Met	Ser	Asp 430	Gly	Pro
60	Gly	Gly	Asn 435	Lys	Trp	Met	Tyr	Val 440	Gly	Arg	Asn	Lys	Ala 445	Gly	Gln	Val
65	Trp	Arg 450	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn 455	Arg	Ser	Gly	Thr	Val 460	Thr	Ile	Asn	Ala



# ES 2 608 964 T3

Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp  
465 470 475 480

5 Val Asn Asn

## REIVINDICACIONES

1. Una composición limpiadora que comprende:
  - (a) una variante de una alfa-amilasa progenitora, preferentemente una variante aislada, que comprende una alteración en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, en donde cada alteración es, independientemente, una sustitución, deleción o inserción, y en donde una de las alteraciones es una sustitución en una posición correspondiente a la posición E260 del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1 y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en G, H, I, K, R, T e Y; y en donde la variante tiene al menos 80% o al menos 87%, pero menos de 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1, y en donde la variante tiene una actividad alfa-amilasa y una capacidad limpiadora mejorada a una temperatura de 5-35 °C en comparación con la alfa-amilasa de la SEC ID N.º 1; y
    - (b) un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9% en peso.
2. Una composición según la reivindicación 1, en donde la alteración es una sustitución.
3. Una composición según la reivindicación 1 o 2, en donde la variante comprende una sustitución en tres posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477.
4. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde la variante comprende una sustitución en cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304, W140, W189, D134, E260, F262, W284, W347, W439, W469, G476, y G477.
5. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde la variante comprende una sustitución en dos, tres o cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304, W140, E260 y G476.
6. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde, además de E260GHIKRTY, la variante comprende también una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en G304R, W140YF, W189EGT, D134E, W284DFR, W439RG, G476EK, G477EKMR.
7. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde, además de E260GHIKRTY, la variante comprende sustituciones en una, dos o tres posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304R, W140YF, y G476EK.
8. Una composición según la reivindicación 7, en donde las sustituciones de la variante comprenden en las dos, tres o cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en G304R, W140Y, E260G y G476K.
9. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde la variante comprende además una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en N195F, V206Y, Y243F, G109A, G273DV, G337N, K72R, R181H, S303G y Y100I.
10. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde el número de alteraciones en las variantes es de 2-20, por ejemplo, 2-10 y 2-5, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.
11. Una composición según cualquier reivindicación anterior, que tiene al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 95% de identidad, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 1.
12. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde la variante comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones del polipéptido de la SEC ID N.º 1, seleccionado del grupo que consiste en:  
 W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+G477E,  
 W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260T+W284D,  
 G109A+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 W140Y +N195F+V206Y +Y243F+E260G,  
 N195F+V206Y+Y243F+E260K+W284D,  
 W140Y+N195F+V206Y +Y243F+E260G+G476E,  
 W140Y +W189G+N195F+V206Y+ Y243F+E260G,  
 W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+S303G,  
 W140Y +W189T +N195F+V206Y +Y243F+E260G,  
 W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+W284D,  
 Y100I+W140Y +N195F+V206Y +Y243F+E260G,  
 W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+G337N,  
 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
 G109A+ W140Y+ E194D+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G

- G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
T5II+ Y100I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
T5II+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
T5II+ S52Q+ N54K+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
5 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G304R+ G476K  
W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284R+ G477K  
W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284F+ G477R, y  
N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D.
- 10 13. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde la variante consiste en sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones del polipéptido de la SEC ID N.º: 1, seleccionado del grupo que consiste en:  
W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+G477E,  
15 W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260T+W284D,  
G 109A+W140Y +N195F+V206Y +Y243F+E260G,  
W140Y +N195F+V206Y +Y243F+E260G,  
N195F+V206Y +Y243F+E260K+W284D,  
W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+G476E,  
W140Y +W189G+N195F+V206Y + Y243F+E260G,  
20 W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+S303G,  
W140Y+W189T+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+W284D,  
Y100I+W 140Y +N 195F+ V206Y + Y243F+E260G,  
W140Y +N195F+ V206Y +Y243F+E260G+G337N,  
25 W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
G109A+ W140Y+ E194D+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
T5II+ Y100I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
T5II+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
30 T5II+ S52Q+ N54K+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G304R+ G476K  
W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284R+ G477K  
W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284F+ G477R, y  
N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D
- 35 14. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde la variante comprende alteraciones en las posiciones correspondientes a las posiciones del polipéptido de la SEC ID N.º: 1, seleccionadas del grupo que consiste en:  
D183\*+ G184\*+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G477E,  
40 D183\*+ G184\*+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260T+W284D,  
D183\*+ G184\*+G109A+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G476E,  
45 D183\*+ G184\*+ W140Y+W189G+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+S303G,  
D183\*+ G184\*+ W140Y+W189T+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+W284D,  
D183\*+ G184\*+ Y100I+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G337N,  
50 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
D183\*+ G184\*+ G109A+ W140Y+ E194D+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
D183\*+ G184\*+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
D183\*+ G184\*+ T5II+ Y100I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
D183\*+ G184\*+ T5II+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
55 D183\*+ G184\*+ T5II+ S52Q+ N54K+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G304R+ G476K  
D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284R+ G477K  
D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284F+ G477R, y  
D183\*+ G184\*+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D
- 60 15. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde la variante consiste en alteraciones en las posiciones correspondientes a las posiciones del polipéptido de la SEC ID N.º: 1, seleccionadas del grupo que consiste en:  
D183\*+ G 184\*+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G+G477E,  
65 D183\*+ G184\*+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260T+W284D,  
D183\*+ G184\*+G109A+W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,

- D183\*+ G184\*+ W140Y+N195F+V206Y+Y243F+E260G,  
 D183\*+ G184\*+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260K+ W284D,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ W189G+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G,  
 5 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ S303G,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ W189T+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D,  
 D183\*+ G184\*+ Y100I+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G,  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G337N,  
 10 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W439R  
 D183\*+ G184\*+ G109A+ W140Y+ E194D+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
 D183\*+ G184\*+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
 D183\*+ G184\*+ T511+ Y100I+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G  
 D183\*+ G184\*+ T511+ G109A+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+E260G+ W439R  
 15 D183\*+ G184\*+ T511+ S52Q+ N54K+ G109A+W140Y+N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G476E  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ G304R+ G476K  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284R+ G477K  
 D183\*+ G184\*+ W140Y+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284F+ G477R, y  
 20 D183\*+ G184\*+ N195F+ V206Y+ Y243F+ E260G+ W284D.
16. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde la variante comprende además deleciones en las posiciones correspondientes a las posiciones G182\*+D183\* o D183\*+G184\* de la SEC ID N.º1.
- 25 17. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde la variante comprende además sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones N195F+V206Y+Y243F de la SEC ID N.º1.
- 30 18. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde el adyuvante de limpieza comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en (i) microcápsula de perfume; (ii) agente de matizado de tejidos; (iii) proteasa; (iv) polímero anfifílico limpiador; (v) lipasa, o (vi) mezclas de los mismos.
19. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es una composición detergente para lavado de ropa líquida o una composición detergente en dosis unitaria.
- 35 20. Un método para tratar una superficie, preferiblemente un material textil, que comprende:
- (i) formar una solución de lavado acuosa que comprende agua y una composición según cualquier reivindicación anterior  
 (ii) tratar la superficie con la solución de lavado acuosa preferiblemente a una temperatura de 40 °C o menos, o más preferiblemente a una temperatura de 35 °C o menos, con máxima preferencia a una temperatura de 30 °C o menos; y  
 40 (iii) enjuagar la superficie.