

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 330**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2000** **E 03024829 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013** **EP 1428874**

54 Título: **Variante de lipasa**

30 Prioridad:

31.03.1999 DK 44199

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

VIND, JESPER;
SVENDSEN, ALLAN;
PATKAR, SHAMKANT A.;
ANDERSEN, KIM V.;
HALKIER, DORTE A. y
BOJSEN, KIRSTEN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 445 330 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

Variante de lipasa

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a variantes de lipasa adecuadas para uso en composiciones detergentes. Más particularmente, la invención se refiere a variantes de la lipasa tipo salvaje de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109 que muestra un efecto de primer lavado.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Durante varios años, las lipasas han sido usadas como enzimas de detergente para eliminar manchas de lípidos o grasas de ropa y otros tejidos, particularmente una lipasa derivada de *Humicola lanuginosa* (EP 258 068 y EP 305 216) vendida bajo el nombre comercial Lipolase® (producto de Novo Nordisk A/S).

[0003] WO 92/05249, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202 revelan variantes de la lipasa de *H. lanuginosa* con propiedades mejoradas para uso detergente. Así, WO 97/04079 divulga variantes con una adición peptídica (extensión) en el N-terminal y/o el C-terminal. WO 97/07202 divulga variantes de lipasa con "rendimiento de primer lavado" que son capaces de eliminar cantidades sustanciales de manteca de cerdo de una muestra manchada de manteca de cerdo en un ciclo de lavado.

[0004] Hay siempre una necesidad existente de suministrar lipasas nuevas con propiedades de lavado en una variedad de detergentes comerciales. La presente invención se refiere a tales lipasas nuevas.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] Los inventores han encontrado que determinadas variantes de Lipolasa (lipasa de tipo salvaje de *Humicola lanuginosa*) tienen un rendimiento de primer lavado particularmente bueno en una solución de detergente. Las lipasas pueden proporcionar además beneficios adicionales, tales como mantenimiento de blancura y limpieza de suciedad.

[0006] Los inventores encontraron que las variantes deberían comprender una o más sustituciones con aminoácidos positivos cerca del N-terminal en la estructura tridimensional. Las variantes deberían comprender además una adición peptídica al C-terminal y/o deberían encontrar ciertas limitaciones en aminoácidos eléctricamente cargados en posiciones 90-101 y 210.

[0007] Por consiguiente, la invención proporciona una lipasa que es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene al menos un 95% de identidad con la lipasa tipo salvaje derivada de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109 y (b) en comparación con dicha lipasa tipo salvaje, comprende una sustitución de T231R+N233R; y (I) comprende una adición peptídica al C-terminal; y/o (II) presenta las siguientes limitaciones: (i) comprende un aminoácido negativo en la posición E210 de dicha lipasa de tipo salvaje; (ii) comprende un aminoácido negativamente cargado en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje; y (iii) comprende un aminoácido negativo o neutro en una posición correspondiente a N94 de dicha lipasa tipo salvaje y/o tiene una carga eléctrica neta neutra o negativa en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Lipasa *Humicola lanuginosa*

[0008] La lipasa de referencia usada en esta invención es la lipasa tipo salvaje derivada de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109. Está descrito en los documentos EP 258 068 y EP 305 216 y tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-269 de SEC ID n.º: 2 de US 5,869,438. En esta especificación, la lipasa de referencia es también denominada Lipolasa.

55 Sustitución con aminoácido positivo

[0009] La lipasa de la invención comprende uno o más (p. ej. 2-4, particularmente dos) sustituciones de un aminoácido cargado negativamente o eléctricamente neutro cerca de E1 o Q249 con un aminoácido positivamente cargado, preferiblemente R.

[0010] La sustitución está en la superficie de la estructura tridimensional dentro de 15 Å de E1 o Q249, por ejemplo en

ES 2 445 330 T3

cualquiera de las posiciones 1-11, 90, 95, 169, 171-175, 192-211, 213-226, 228-258, 260-262.

[0011] La sustitución puede estar dentro de 10 Å de E1 o Q249, por ejemplo en cualquiera de las posiciones 1-7, 10, 175, 195, 197-202, 204-206, 209, 215, 219-224, 230-239, 242-254.

[0012] La sustitución puede estar dentro de 15 Å de E1, por ejemplo en cualquiera de las posiciones 1-11, 169, 171, 192-199, 217-225, 228-240, 243-247, 249, 261-262.

[0013] La sustitución está más preferiblemente dentro de 10 Å de E1, por ejemplo en cualquiera de las posiciones 1-7, 10, 219-224 y 230-239.

[0014] Así, algunas sustituciones preferidas son S3R, S224R, P229R, T231 R, N233R, D234R y T244R.

Adición peptídica a C-terminal

[0015] La lipasa puede comprender una adición peptídica fijada a C-terminal L269. La adición peptídica mejora el rendimiento de primer lavado en una variedad de detergentes.

[0016] La adición peptídica preferiblemente consiste en 1-5 aminoácidos, por ejemplo 2, 3 o 4 aminoácidos. Los aminoácidos de la adición peptídica serán numerados 270, 271, etc.

[0017] La adición peptídica puede consistir en aminoácidos eléctricamente neutros (p. ej. hidrófobos), por ejemplo PGL o PG. En una forma de realización alternativa, la adición de péptido de lipasa consiste en aminoácidos neutros (p. ej. hidrófobos) y el aminoácido C, y la lipasa comprende sustitución de un aminoácido con C en una ubicación adecuada para formar un puente disulfuro con el C de la adición peptídica. Ejemplos son:

270C enlazado a G23C o T37C

271 C enlazado a K24C, T37C, N26C o R81 C

272C enlazado a D27C, T35C, E56C, T64C o R81C.

Aminoácidos en posiciones 90-101 y 210

[0018] La lipasa de la invención preferiblemente presenta ciertas limitaciones en aminoácidos eléctricamente cargados en posiciones 90-101 y 210. Las lipasas que presentan limitaciones de carga son particularmente eficaces en un detergente con alto contenido de aniónico.

[0019] Así, el aminoácido 210 puede ser negativo. E210 puede estar invariado o puede tener la sustitución E210D/C/Y, particularmente E210D.

[0020] La lipasa puede comprender un aminoácido cargado negativamente en cualquiera de las posiciones 90-101 (particularmente 94-101), por ejemplo en la posición D96 y/o E99.

[0021] Además, la lipasa puede comprender un aminoácido neutro o negativo en la posición N94, es decir N94 (neutro o negativo), por ejemplo N94N/D/E.

[0022] También, la lipasa puede tener una carga eléctrica neta neutra o negativa en la región 90-101 (particularmente 94-101), es decir el número de aminoácidos negativos es igual o mayor al número de aminoácidos positivos. Así, la región puede estar invariada de la Lipolasa, que tiene dos aminoácidos negativos (D96 y E99) y un positivo (K98), y con un aminoácido neutro en la posición 94 (N94), o la región se puede modificar por una o más sustituciones.

[0023] Alternativamente, dos de los tres aminoácidos N94, N96 y E99 pueden tener una carga eléctrica negativa o invariada. Así, los tres aminoácidos pueden ser invariados o se pueden cambiar por una sustitución conservadora o negativa, es decir N94 (neutro o negativo), D (negativo) y E99 (negativo). Ejemplos son N94D/E y D96E. También, uno de los tres se puede sustituir para aumentar la carga eléctrica, es decir N94 (positivo), D96 (neutro o positivo) o E99 (positivo o neutro). Ejemplos son N94K/R, D96I/L/N/S/W o E99N/Q/K/R/H.

[0024] La sustitución de un aminoácido neutro con uno negativo (N94D/E), puede mejorar el rendimiento en un detergente aniónico. La sustitución de un aminoácido neutro con un aminoácido positivo (N94K/R) puede proporcionar una lipasa variante con buen rendimiento tanto en un detergente aniónico como en un detergente aniónico/no iónico (un detergente con

por ejemplo 40-70 % aniónico respecto al surfactante total).

Aminoácidos en otras posiciones

- 5 [0025] Los inventores han encontrado que una sustitución Q249R/K/H puede mejorar el rendimiento tanto en un detergente aniónico como en aniónico/no iónico, y que una sustitución de R209 con un aminoácido neutro o negativo (p. ej. R209P/S) puede mejorar el rendimiento en el detergente aniónico. La lipasa puede opcionalmente comprender la sustitución G91A.
- 10 [0026] La lipasa puede opcionalmente comprender sustituciones de uno o más aminoácidos adicionales. Tales sustituciones pueden, por ejemplo, ser hechas según principios conocidos en la técnica, por ejemplo sustituciones descritas en WO 92/05249, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

Combinaciones de sustituciones

- 15 [0027] Una variante de lipasa con buen rendimiento de primer lavado se puede obtener modificando la Lipolasa de la siguiente manera. Las sustituciones entre paréntesis son opcionales.

T231R+ N233R
N94K+ D96L+ T231R+ N233R+ Q249R+ 270P+ 271G+ 272L
D96L+ T231R+ N233R
G91A+ E99K+ T231R+ N233R +Q249R
(N33Q) +D96L +T231R +N233R +Q249R +270PGL
R209P +T231R +N233R
(N33Q) +E99N +N101S +T231R +N233R +Q249R +270 PGL
K24C +(N33Q) +D96S +T231R +N233R +Q249R +270 PCL
(N33Q) +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270 PGL
E1A +(N33Q) +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270 PGL
(N33Q) +G91A +E99K +G255R +T231R +N233R +Q249R +270 PGL
(N33Q) +G91A +E99K +T231R +N233R +T244R +Q249R +270 PGL
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
E87K +G91D +D96L +G225P +T231 R +N233R +Q249R +N251D
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270AGVF
G91A +E99K +T189G +T231R +N233R +Q249R
D102G +T231R +N233R +Q249R
T231R +N233R +Q249R +270AGVF
R209P +T231 R +N233R
N33Q +N94K +D96L +T231R +N233R +Q249R +270PGLPFKRV
N33Q +N94K +D96L +T231R +N233R +Q249R
N33Q +D96S +T231 R +N233R +Q249R
N33Q +D96S +V2281 + +T231R +N233R +Q249R
E1A +N33Q +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270PGLPFKRV
N33Q +S83T +E87K +G91A + E99K +T231R +N233R +Q249R +270PGLPFKRV
N33Q +G91A + E99K +T231R +N233R +Q249R +270PGLPFKRV
T231R +N233R +270CP
T231R +N233R +270RE
N33Q +E99N +N101S +T231 R +N233R +Q249R +270PGLPFKRV
D62A +S83T + G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
E99N +N101S +T231R +N233R +Q249R
R84W +G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270SPG
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270VVP
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270LLASSGRGGHR
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270VTT
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270VLQ
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270TST
G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270LRI
V60G +D62E +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
G91A +D96W +E99K +T231R +N233R +G263Q +L264A +I265T +G266S +T267A +L269N +270AGGFS

Nomenclatura para modificaciones de aminoácidos

[0028] La nomenclatura usada aquí para definir mutaciones es esencialmente como se describe en WO 92/05249. Así, T231R indica una sustitución de T en la posición 231 con R. PGL o 270P+ 271 G+ 272L indica la adición peptídica PGL fijada al C-terminal (L269).

Agrupación de aminoácidos

[0029] En esta especificación, los aminoácidos se clasifican como cargados negativamente, cargados positivamente o eléctricamente neutros según su carga eléctrica a pH 10, que es típico del detergente de la invención. Así, los aminoácidos negativos son E, D, C (cisteína) e Y, particularmente E y D. Los aminoácidos positivos son R, K y H, particularmente R y K. Los aminoácidos neutros son G, A, V, L, I, P, F, W, S, T, M, N, Q y C cuando forman parte de un puente disulfuro. Una sustitución con otro aminoácido del mismo grupo (negativo, positivo o neutro) se denomina una sustitución conservadora.

[0030] Los aminoácidos neutros se pueden dividir en hidrófobos (G, A, V, L, I, P, F, W y C como parte de un puente disulfuro) e hidrófilos (S, T, M, N, Q).

Identidad de aminoácido

[0031] La variante de lipasa de la invención tiene una identidad de aminoácido de al menos un 90 % (preferiblemente más de un 95 % o más de un 98 %) con la Lipolasa.

[0032] El grado de identidad puede ser adecuadamente determinado mediante programas informáticos conocidos en la técnica, tal como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG (Program Manual para el Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE. UU. 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45), utilizando GAP con los siguientes ajustes para la comparación de secuencias polipeptídicas: penalización de creación del espacio de 3,0 y penalización de extensión del espacio de 0,1.

Secuencia de ADN, Vector de expresión, Célula huésped, Producción de lipasa

[0033] La invención proporciona una secuencia de ADN que codifica la lipasa de la invención, un vector de expresión que contiene la secuencia de ADN, y una célula huésped transformada con la secuencia de ADN o el vector de expresión. Estos se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica.

[0034] La invención también proporciona un método para producir la lipasa por cultivo de la célula huésped transformada bajo condiciones propicias para la producción de la lipasa y la recuperación de la lipasa del caldo resultante. El método se puede practicar según principios conocidos en la técnica.

Aditivo de detergente

[0035] Según la invención, la lipasa puede típicamente ser usada como un aditivo en una composición de detergente. Este aditivo es convenientemente formulado como un granulado que no produce polvo, un líquido estabilizado, una suspensión o una enzima protegida. El aditivo se puede preparar por métodos conocidos en la técnica.

COMPOSICIÓN DE DETERGENTE

[0036] Las composiciones detergentes de la invención pueden por ejemplo, ser formulados como composiciones de detergente para colada a mano y a máquina que incluyen composiciones de aditivo de lavandería y composiciones adecuadas para el uso en el pretratamiento de tejidos manchados, composiciones de suavizante con enjuague añadido y composiciones para el uso en operaciones generales de limpieza de superficies duras domésticas y operaciones de lavado de la vajilla.

[0037] La composición de detergente de la invención comprende la lipasa de la invención y un surfactante. Adicionalmente, puede opcionalmente comprender un constructor, otra enzima, un supresor de espuma, un agente suavizante, un agente de inhibición de transferencia de color y otros componentes convencionalmente utilizados en detergentes tales como agentes de suspensión de la suciedad, agentes de liberación de la suciedad, blanqueadores ópticos, abrasivos, bactericidas, inhibidores de decoloración, agentes colorantes y/o perfumes encapsulados o no encapsulados.

[0038] La composición de detergente según la invención puede estar en forma de líquido, pasta, geles, barras o formas granulosas. El pH (medido en la solución acuosa a la concentración de uso) usualmente será neutro o alcalino, por ejemplo

en el rango de 7-11, particularmente 9-11. Composiciones granulosas según la presente invención pueden estar también en "forma compacta", es decir, pueden tener una densidad relativamente más alta que los detergentes granulosos convencionales, es decir de 550 a 950 g/l.

[0039] La lipasa de la invención, u opcionalmente otra enzima incorporada en la composición de detergente, está normalmente incorporada en la composición de detergente a un nivel de 0,00001% a 2% de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente a un nivel de 0,0001% a 1% de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente a un nivel de 0,001% a 0,5% de proteína enzimática en peso de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel de 0,01% a 0,2% de proteína enzimática en peso de la composición.

[0040] La composición de detergente de la invención puede comprender la lipasa en una cantidad correspondiente a 10-50,000 LU por gramo de detergente, preferiblemente 20-5,000 LU/g, por ejemplo 100-1000 LU/g. El detergente puede estar disuelto en agua para producir una solución de lavado que contiene enzima lipolítica en una cantidad correspondiente a 25-15,000 LU por litro de solución de lavado, particularmente 100 - 5000 LU/l, por ejemplo 300-2000 LU/l. La cantidad de proteína de lipasa puede ser 0,001-10 mg por gramo de detergente o 0,001-100 mg por litro de solución de lavado.

[0041] Más específicamente, la lipasa de la invención se puede incorporar en las composiciones detergentes descritas en WO 97/04079, WO 97/07202, WO 97/41212, PCT/DK WO 98/08939 y WO 97/43375.

Sistema de surfactante

[0042] El sistema de surfactante puede comprender surfactantes no iónicos, aniónicos, catiónicos, anfóteros y/o surfactantes zwitteriónicos. Como se ha descrito anteriormente, las variantes de lipasa de la invención son particularmente adecuadas para detergentes que comprenden una combinación de surfactante no iónico y aniónico con un 70-100 % en peso de surfactante aniónico y 0-30 % en peso de no iónico, particularmente 80-100 % de surfactante aniónico y 0-20 % no iónico. Como está además descrito, algunas lipasas preferidas de la invención son también adecuadas para detergentes que comprenden 40-70 % de surfactante aniónico y 30-60 % de surfactante no iónico.

[0043] El surfactante está típicamente presente a un nivel de 0,1% a 60% en peso, por ejemplo 1% a 40%, particularmente 10-40%, preferiblemente de aproximadamente 3% a aproximadamente 20% en peso. Algunos ejemplos de tensioactivos están descritos a continuación.

Tensioactivos aniónicos

[0044] Tensioactivos aniónicos preferidos incluyen alquil sulfato, alquil etoxi sulfato, sulfonato de alquilo lineal de benceno y mezclas de estos.

[0045] Los tensioactivos de sulfato de alquilo son sales hidrosolubles o ácidos de fórmula $ROSO_3M$ donde R es preferiblemente un hidrocarbilo $C_{10}-C_{24}$, preferiblemente un alquilo o hidroalquilo con un componente alquilo $C_{10}-C_{20}$, más preferiblemente un alquilo o hidroalquilo $C_{12}-C_{18}$, y M es H o un catión, por ejemplo, un catión de metal alcalino (p. ej. sodio, potasio, litio), o amonio o amonio sustituido.

[0046] Sulfonatos de alquilbenceno son adecuados, especialmente sulfonatos lineales (cadena lineal) de alquilbenceno (LAS) donde el grupo alquilo contiene preferiblemente de 10 a 18 átomos de carbono.

[0047] Tensioactivos aniónicos adecuados incluyen sulfatos alquil alcoxilados que son sales hidrosolubles o ácidos de fórmula $RO(A)_mSO_3M$ donde R es un alquilo $C_{10}-C_{24}$ no sustituido o un grupo hidroalquilo con un componente alquilo $C_{10}-C_{24}$, preferiblemente un alquilo o hidroalquilo $C_{12}-C_{20}$, más preferiblemente alquilo o hidroalquilo $C_{12}-C_{18}$, A es una unidad propoxi o etoxi, m es mayor de cero, típicamente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 6, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3, y M es H o un catión que puede ser, por ejemplo, un catión metálico (p. ej., sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, etc.), amonio o catión de amonio sustituido. Sulfatos alquil etoxilados al igual que sulfatos alquil propoxilados son contemplados aquí. Ejemplos específicos de cationes de amonio sustituidos incluyen cationes de metil, dimetil, trimetil-amonio y cationes de amonio cuaternario tal como tetrametilamonio y cationes de dimetil piperidinio y aquellos derivados de alquilaminas tal como etilamina, dietilamina, trietilamina, mezclas derivadas, y similares.

[0048] Otros tensioactivos aniónicos incluyen sales (incluyendo, por ejemplo, sales de sodio, potasio, amonio y amonio sustituido tal como sales de mono- di- y trietanolamina) de jabón, alcanosulfonatos secundarios o primarios C_8-C_{22} , olefinsulfonatos C_8-C_{24} , ácidos policarboxílicos sulfonatados preparados por sulfonación del producto pirrolizado de citratos de metal alcalinotérreo.

Surfactante no iónico

[0049] El surfactante puede comprender condensados de óxido de polialquileño (p. ej. óxido de polietileno) de alquil fenoles. El grupo alquilo puede contener de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono, en una cadena lineal o cadena ramificada. El óxido de etileno puede estar presente en una cantidad igual a de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 moles por mol de alquil fenol.

[0050] El surfactante también puede comprender productos de condensación de alcoholes alifáticos secundarios y primarios con aproximadamente 1 a aproximadamente 25 moles de óxido de etileno. La cadena de alquilo del alcohol alifático puede ser bien recta o ramificada, y contiene generalmente de aproximadamente 8 a aproximadamente 22 átomos de carbono.

[0051] Además, el surfactante no iónico puede comprender condensados de óxido de polietileno de alquil-fenoles, productos de condensación de alcoholes alifáticos secundarios y primarios con de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 moles de óxido de etileno, alquilpolisacáridos, y mezclas de los mismos. Más preferido son etoxilatos de alquil fenol C_8 - C_{14} con de 3 a 15 grupos etoxi y alcohol etoxilatos C_8 - C_{18} (preferiblemente C_{10} de media) que tienen de 2 a 10 grupos etoxi, y sus mezclas derivadas.

[0052] Agentes tensioactivos no iónicos preferidos son alcohol etoxilato, alcohol fenol etoxilato, amida de polihidroxi ácido graso, poliglucósido de alquilo y mezclas de estos.

EJEMPLO

Rendimiento de primer lavado a varias dosificaciones en el detergente aniónico

[0053] Las siguientes 5 variantes según la invención fueron preparadas y evaluadas con 3 tipos de muestras sucias, y la lipasa progenitora fue incluida para la comparación:

T231R +N233R.
G91A +D96W +E99K +G263Q +L264A +I265T +G266D +T267A +L269N
+270AGGFSWRRYRSAESVDKTRATMTDAELEKKLNSYVQMDKEYVKNNQARS
R209P +T231R +N233R
N33Q +D96S +T231R +N233R +Q249R
E99N +N101S +T231R +N233R +Q249R

[0054] Un detergente comercial de EE. UU. con un contenido alto de surfactante aniónico fue calentado para inactivar las enzimas ya presentes, y fue usado a 1,4 g/l en una lavadora de laboratorio Tergot-o-meter™. La dureza del agua fue 6°dH (Ca:Mg 2:1), y las condiciones de lavado fueron 1 ciclo a 30°C durante 12 minutos, seguido de secado toda la noche en el papel de filtro. La variante de lipasa fue añadida a dosificaciones de 6400 y 12800 LU/l. Determinaciones dobles fueron hechas en dos lavados separados (mismo TOM).

[0055] Los siguientes tres tipos de muestras textiles evaluados fueron: manteca de cerdo/rojo Sudán en algodón Style 400, preparado reciente; wfk 20-LS lápiz de labios en poliéster/algodón; y wfk 10-LS lápiz de labios en algodón. La eliminación de suciedad fue evaluada por medición de la reemisión a 460 nm después del primer ciclo de lavado, y los resultados fueron expresados como ΔR por substracción de la reemisión de un blanco sin enzima.

[0056] Los resultados fueron que cada variante a cada dosificación mostró un rendimiento de primer lavado mejorado en cada tipo de muestra sucia (ΔR de 5 a 13), mientras que la enzima parental no tuvo esencialmente ningún efecto ($\Delta R = 0 \pm 2$) bajo las mismas condiciones.

REIVINDICACIONES

1. Lipasa que es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que:
 - a) tiene al menos 95 % identidad con la lipasa tipo salvaje derivada de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109;
 - b) en comparación con dicha lipasa tipo salvaje, comprende una sustitución de T231 R +N233R; y
 - I) comprende una adición peptídica al C-terminal; y/o
 - II) presenta las siguientes limitaciones:
 - i) comprende un aminoácido negativo en la posición E210 de dicha lipasa tipo salvaje;
 - ii) comprende un aminoácido cargado negativamente en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje; y
 - iii) comprende un aminoácido neutro o negativo en una posición correspondiente a N94 de dicha lipasa tipo salvaje y/o tiene una carga eléctrica neta neutra o negativa en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa tipo salvaje.
2. Lipasa de la reivindicación precedente que comprende 2-4 (preferiblemente dos) de dichas sustituciones.
3. Lipasa según cualquier reivindicación precedente que comprende aminoácidos con carga eléctrica invariada o negativa en al menos dos de las posiciones N94, D96 y E99 de dicha lipasa tipo salvaje.
4. Lipasa de cualquier reivindicación precedente que comprende una sustitución G91A, N94D/E/K/R, D96E/I/L/N/S/W, E99N/Q/K/R/H o N101S.
5. Lipasa de cualquier reivindicación precedente que comprende las sustituciones D96 (positivo o neutro) +Q249R/K/H, opcionalmente combinados con R209 (negativo o neutro).
6. Lipasa de cualquier reivindicación precedente con una secuencia de aminoácidos que se obtiene modificando la lipasa tipo salvaje derivada de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109 de la siguiente manera:
 - a) T231 R +N233R,
 - b) R209P +T231 R +N233R,
 - c) N33Q +D96S +T231R +N233R +Q249R o
 - d) E99N +N101S +T231R +N233R +Q249R.
7. Lipasa según la reivindicación 1 donde los aminoácidos en posiciones 90-101 y 210 son invariados.
8. Composición de detergente que comprende un surfactante y la lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Composición de detergente de la reivindicación precedente donde el surfactante comprende surfactante aniónico en una cantidad superior a 70 % en peso del surfactante total.
10. Secuencia de ADN que codifica la lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
11. Vector de expresión que contiene la secuencia de ADN de la reivindicación precedente.
12. Célula huésped transformada que contiene la secuencia de ADN según la reivindicación 10 o el vector de expresión según la reivindicación 11.
13. Método para producir la lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, el cual método comprende el cultivo de la célula huésped transformada según la reivindicación 12 bajo condiciones que permitan la producción de la lipasa y la recuperación de la lipasa del caldo resultante.