

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 145**

51 Int. Cl.:

C11D 1/02 (2006.01)

C11D 1/14 (2006.01)

C11D 1/22 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/EP2012/076468**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13098205**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12812640 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2798053**

54 Título: **Composiciones detergentes con variantes de lipasa**

30 Prioridad:

29.12.2011 EP 11196000

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

04.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VIND, JESPER;
MIKKELSEN, LISE MUNCH;
MALTEN, MARCO;
SVENDSEN, ALLAN y
BORCH, KIM**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

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

ES 2 680 145 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones detergentes con variantes de lipasa

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta patente contiene un listado de secuencias.

Antecedentes de la invención

10

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a composiciones detergentes, métodos de obtención de las mismas y métodos de limpieza que utilizan la composición detergente de la invención.

15

Descripción de la técnica relacionada

[0003] Las composiciones detergentes se desarrollan continuamente para optimizar y mejorar su eficiencia de limpieza.

20

Se basan en una mezcla compleja de varios ingredientes entre los cuales se incluyen surfactantes y enzimas. Sin embargo, las lipasas son en general inestables en presencia de surfactantes aniónicos, lo que afecta a la estabilidad de la composición. Por lo tanto, sería deseable obtener composiciones detergentes con estabilidad mejorada que comprendan tanto surfactantes aniónicos como lipasas.

25

[0004] WO92/05249 se refiere a variantes de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* con propiedades mejoradas. Aunque el documento describe que las variantes pueden comprender una sustitución en la posición del aminoácido D254, no muestra ni indica que esta posición particular sea importante para obtener una variante estable que se pueda utilizar para suministrar composiciones detergentes estabilizadas que comprendan surfactantes aniónicos.

30

[0005] US5,892,013A divulga un método de obtención de una composición detergente con estabilidad mejorada que usa variantes de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* que comprenden sustituciones D254NKRAQTSLV.

35

[0006] WO2008/079685 se refiere a variantes de lipasa para uso farmacéutico. Las variantes de lipasa incluyen variantes de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* que comprenden sustituciones T231R y N233R, al igual que al menos una sustitución adicional seleccionada de una lista que incluye D254AGIKLMNRQSY.

40

[0007] WO2009/106553 divulga una composición detergente que comprende surfactantes aniónicos y variantes de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* que comprenden sustituciones T231R y N233R.

40

Resumen de la invención

[0008] La presente invención se refiere a métodos de obtención de una composición detergente que comprende la introducción (a) de una variante de lipasa de una lipasa progenitora, variante que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2, una sustitución en una posición que corresponde a T231R+N233R y D254STNYHQ del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 y tiene actividad lipásica y (b) de un surfactante aniónico, donde dicha composición tiene estabilidad aumentada en comparación con una composición correspondiente que comprende la lipasa progenitora. La invención también se refiere a composiciones detergentes obtenidas por un método de la invención al igual que a métodos de limpieza que comprenden un paso de distribuir la composición detergente de la invención a un objeto que se va a limpiar.

50

Definiciones

[0009] **Lipasa:** el término "lipasa" o "enzima lipolítica" o "esterasa lipídica" es una enzima en la clase EC 3.1.1 tal y como se define en la Nomenclatura de enzimas. Puede tener actividad lipásica (triacilglicerol lipasa, EC 3.1.1.3), actividad de cutinasa (EC 3.1.1.74), actividad de estero esterasa (EC 3.1.1.13) y/o actividad de hidrolasa de éster ceroso (EC 3.1.1.50). Para los fines de la presente invención, la actividad lipásica se determina según el procedimiento descrito en los ejemplos. En un aspecto, las variantes de la presente invención tienen al menos el 20 %, por ejemplo, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 100 % de la actividad lipásica del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

60

65

[0010] **Variante alélica:** el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o formas más alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin

cambio 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 [0011] **ADNc:** el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm empalmado maduro obtenido a partir de una célula eucariótica o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN primario inicial es un precursor de ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, que incluyen empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

10 [0012] **Secuencia codificante:** el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.

15 [0013] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o foránea (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante o nativa o foránea entre ellas. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptidos, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación del polinucleótido que codifica una variante.

25 [0014] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de una variante entre los que se incluyen, pero de forma no limitativa, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

30 [0015] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está operativamente enlazado a secuencias de control que proporcionan su expresión.

35 [0016] **Fragmento:** el término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del terminal amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad lipásica. En un aspecto, un fragmento contiene al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % y al menos el 95 % del número de aminoácidos del polipéptido maduro.

40 [0017] **Condiciones de alta astringencia:** el término "condiciones de alta astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50 % de formamida, después de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 65 °C.

45 [0018] **Célula huésped:** el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción, o similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

50 [0019] **Propiedad mejorada:** el término "propiedad mejorada" significa una característica asociada con una variante que se mejora en comparación con la progenitora. Tales propiedades mejoradas incluyen, pero de forma no limitativa, estabilidad química, estabilidad de oxidación, estabilidad de pH, estabilidad bajo condiciones de almacenamiento, estabilidad a surfactantes y micelas de surfactantes, y termoestabilidad.

55 [0020] **Aislada:** el término "aislada" significa una sustancia en una forma o ambiente que no ocurre en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no ocurra de forma natural, (2) cualquier sustancia, que incluye, pero de forma no limitativa, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se extrae al menos parcialmente de uno o más o todos los ingredientes de origen natural con los que se asocia en la naturaleza; (3) cualquiera sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a los otros componentes con los que se asocia naturalmente (por ejemplo, múltiples copias de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

65

[0021] **Condiciones de baja astringencia:** el término "condiciones de baja astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado ADN, y 25 % de formamida, después de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 50 °C.

[0022] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como procesamiento del N-terminal, truncamiento del C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro son los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID N.º: 2

[0023] **Secuencia codificante del polipéptido maduro:** el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad lipásica. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro son los nucleótidos 67 a 873 de la SEQ ID N.º: 1.

[0024] **Condiciones de media astringencia:** el término "condiciones de media astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35 % de formamida, después de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 55 °C.

[0025] **Condiciones de media alta astringencia:** el término "condiciones de media alta astringencia" para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado ADN, y o bien 35 % de formamida, después de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 60 °C.

[0026] **Mutante:** el término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

[0027] **Constructo de ácidos nucleicos:** el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácidos nucleicos, bien mono o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existiría de otro modo en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

[0028] **Operativamente enlazado:** el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia de codificación de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante.

[0029] **Progenitor o lipasa progenitora:** el término "progenitor" o "lipasa progenitora" significa una lipasa a la que se hace una sustitución para producir las variantes enzimáticas usadas de acuerdo con la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido de origen natural (de tipo salvaje) o una variante o fragmento del mismo.

[0030] **Identidad de secuencia:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia".

[0031] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "mayor identidad" (obtenido utilizando la opción no resumida) se usa como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de espacios en el alineamiento})$$

[0032] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "mayor identidad" (obtenido utilizando la opción no resumida) se usa como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100) / (Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento)

5 [0033] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" significa un polinucleótido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad lipásica. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90% y al menos el 95 % del número de nucleótidos que codifican el polipéptido maduro.

10 [0034] **Variante:** el término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad lipásica que comprende una sustitución en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa un reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente. Las variantes usadas de acuerdo con la presente invención tienen al menos el 20 %, por ejemplo, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 100 % de la actividad lipásica del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

15 [0035] **Condiciones de muy alta astringencia:** el término "condiciones de muy alta astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50 % de formamida, después de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 70 °C.

20 [0036] **Condiciones de muy baja astringencia:** el término "condiciones de muy baja astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25 % de formamida, después de procedimientos de Southern estándar durante de 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 45 °C.

25 [0037] **Lipasa de tipo salvaje:** el término lipasa "de tipo salvaje" significa una lipasa expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, levadura u hongo filamentoso encontrado en la naturaleza.

30 Convenciones para la designación de variantes

35 [0038] Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 2 se usa para determinar el residuo de aminoácidos correspondiente en otra lipasa. La secuencia de aminoácidos de otra lipasa se alinea con el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 2, y basándose en el alineamiento, el número de posición de los aminoácidos que corresponde con cualquier residuo de aminoácidos en el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 2 se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

40 [0039] La identificación del residuo de aminoácidos correspondiente en otra lipasa se puede determinar mediante un alineamiento de múltiples secuencias polipeptídicas usando diferentes programas informáticos que incluyen, pero de forma no limitativa, MUSCLE (multiple sequence comparison by log-expectation; versión 3,5 o posterior; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh *et al.*, 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh *et al.*, 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900), y EMBOSS EMMA utilizando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson *et al.*, 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), usando sus respectivos parámetros por defecto.

45 [0040] Cuando la otra enzima ha divergido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de manera que la comparación tradicional basada en secuencias no detecta su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), otros algoritmos de comparación de secuencia por pares se pueden usar. Se puede alcanzar mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias utilizando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de (perfiles de) familias de polipéptidos para buscar en las bases de datos. Por ejemplo, el programa BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda de base de datos reiterativa y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Se puede conseguir una sensibilidad incluso superior si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas.

Los programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructuras secundarias, perfiles de alineamiento estructural, y potenciales de disolución) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural para una secuencia de consulta. De forma similar, el método de Gough *et al.*, 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, se puede utilizar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP. Estos alineamientos se pueden usar a su vez para generar modelos de homología para el polipéptido, y tales modelos se pueden evaluar para exactitud utilizando una variedad de herramientas desarrolladas para ese fin.

[0041] Para proteínas de estructura conocida, diversas herramientas y recursos están disponibles para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas de SCOP se han alineado estructuralmente, y esos alineamientos son accesibles y descargables. Dos o más estructuras de proteínas se pueden alinear utilizando una variedad de algoritmos como la matriz de alineamiento de distancias (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos se puede utilizar adicionalmente para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0042] Al describir las variantes usadas de acuerdo con la presente invención, la nomenclatura descrita más adelante se adapta para facilidad de referencia. Se emplea la letra única o la abreviatura de tres letras de aminoácidos aceptadas por la IUPAC.

[0043] Sustituciones. Para una sustitución de aminoácidos, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido progenitor, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 con alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Mutaciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg+Ser411Phe" o "G205R+S411F", que representa sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y de serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

[0044] Sustituciones múltiples. Las variantes que comprenden sustituciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E", que representan una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

[0045] Sustituciones diferentes. Donde se puedan introducir sustituciones diferentes en una posición, las sustituciones diferentes se separan por una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina o ácido glutámico. Así, "Tyr167Gly,Ala+Arg170Gly,Ala" designa las variantes siguientes: "Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Descripción detallada de la invención

[0046] La presente invención se refiere a métodos de obtención de una composición detergente que comprenden la introducción (a) de una variante de lipasa de una lipasa progenitora, variante que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2, una sustitución en una posición que corresponde con T231R+N233R y D254STNYHQ del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 y tiene actividad lipásica y (b) de un surfactante aniónico, donde dicha composición tiene estabilidad aumentada en comparación con una composición correspondiente que comprende la lipasa progenitora.

[0047] La presente invención proporciona además composiciones detergentes y métodos de limpieza que comprenden un paso de distribuir una composición detergente de la invención a un objeto que se va a limpiar.

Variantes

[0048] En una forma de realización, la variante usada de acuerdo con el método de la invención es una variante de lipasa derivada de una lipasa progenitora con al menos el 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2, variante que tiene actividad lipásica y en comparación con la lipasa progenitora comprende una sustitución en una posición que corresponde con T231R+N233R y D254STNYHQ del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 y es más estable en comparación con la lipasa progenitora en presencia de surfactantes aniónicos.

[0049] En una forma de realización, la variante usada de acuerdo con el método de la invención tiene una identidad de secuencia de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 %, pero menos del 100 %, con la secuencia de aminoácidos de la lipasa progenitora.

[0050] En otra forma de realización, la variante usada de acuerdo con el método de la invención tiene al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 %, pero menos del 100 %, con la secuencia de aminoácidos de la lipasa progenitora.

al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 %, pero menos del 100 %, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

5 [0051] En un aspecto, el número de sustituciones en las variantes usadas de acuerdo con el método de la invención puede ser 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sustituciones.

10 [0052] En otro aspecto, la variante usada de acuerdo con el método de la invención comprende o consiste además en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 33. En otro aspecto, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 33 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución N33Q del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

15 [0053] Las variantes usadas de acuerdo con el método de la invención pueden comprender además una o más sustituciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) otras posiciones. En otro aspecto, las variantes usadas de acuerdo con el método de la invención pueden comprender o contener sustituciones seleccionadas de:

- 20 a. T231R +N233R +D254S;
 b. N33Q +T231R +N233R +D254S;
 c. T231R +N233R +D254T;
 d. N33Q +T231R +N233R +D254T;
 e. T231R +N233R +D254N;
 25 f. N33Q +T231R +N233R +D254N;
 g. T231R +N233R +D254Y;
 h. N33Q +T231R +N233R +D254Y;
 i. T231R +N233R +D254H;
 j. N33Q + T231R +N233R +D254H;
 30 k. T231R +N233R +D254Q; o
 l. N33Q +T231R +N233R +D254Q.

35 [0054] Los cambios de aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que no afectan significativamente al plegado y/o actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones del terminal amino o carboxilo, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido enlazador de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación mediante el cambio de carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

40 [0055] Ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en los grupos aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y pequeños aminoácidos (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que no alteran generalmente la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R. L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

50 [0056] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

55 [0057] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la técnica anterior, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad lipásica para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se pueden determinar mediante análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de los aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede inferir a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

65

[0058] Las variantes puede consistir en de 150 a 450 aminoácidos, por ejemplo, de 200 a 400, de 250 a 350 y aproximadamente en 300 aminoácidos.

5 [0059] En una forma de realización, la variante tiene estabilidad química mejorada en comparación con la enzima progenitora.

[0060] En una forma de realización, la variante tiene estabilidad de oxidación mejorada en comparación con la enzima progenitora.

10 [0061] En una forma de realización, la variante tiene estabilidad de pH mejorada en comparación con la enzima progenitora.

[0062] En una forma de realización, la variante tiene estabilidad bajo condiciones de almacenamiento mejorada en comparación con la enzima progenitora.

15 [0063] En una forma de realización, la variante tiene estabilidad hacia surfactantes mejorada en comparación con la enzima progenitora.

20 [0064] En una forma de realización, la variante tiene estabilidad de sustrato mejorada en comparación con la enzima progenitora.

[0065] En una forma de realización, la variante tiene termoestabilidad mejorada en comparación con la enzima progenitora.

25 Lipasas progenitoras

[0066] La lipasa progenitora puede ser (a) un polipéptido que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de baja astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, o (ii) el complemento en toda su longitud de (i); o (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1.

35 [0067] En un aspecto, el progenitor tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %, que tiene actividad lipásica. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del progenitor difiere en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

40 [0068] En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID N.º: 2.

45 [0069] En otro aspecto, el progenitor es un fragmento que contiene al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % del número de aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

50 [0070] En otra forma de realización, el progenitor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0071] En otro aspecto, el progenitor se codifica por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de muy baja astringencia, condiciones de baja astringencia, condiciones de media astringencia, condiciones de media alta astringencia, condiciones de alta astringencia o condiciones de muy alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, o (ii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

60 [0072] El polinucleótido de la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia de la misma, al igual que el polipéptido de la SEQ ID N.º: 2 o un fragmento de la misma, se puede utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica un progenitor a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, después de procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en las mismas. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que toda la secuencia, pero deberían tener una longitud de al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 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. Sondas tanto de ADN como de ARN se pueden usar. Las sondas se marcan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina o avidina).

5

[0073] Una biblioteca de ADN genómico o ADNc preparada a partir de tales otras cepas se puede filtrar para ADN que hibride con las sondas anteriormente descritas y codifique un progenitor. El ADN genómico u otro ADN de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que hibrida con la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

10

[0074] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido hibrida a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con (i) la SEQ ID N.º: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; (iii) el complemento en toda su longitud de la misma; o (iv) una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de muy baja a muy alta astringencia. Las moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar utilizando, por ejemplo, película de rayos X o cualquiera de los otros medios de detección conocidos en la técnica.

15

[0075] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos son los nucleótidos 67 a 873 de la SEQ ID N.º: 1. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID N.º: 2; el polipéptido maduro de la misma; o un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la SEQ ID N.º: 1.

20

25

[0076] En otra forma de realización, el progenitor se codifica por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %.

30

[0077] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal de una región de otro polipéptido.

35

[0078] El progenitor puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido usado de acuerdo con la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce por fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en el marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control del mismo promotor (los mismos promotores) y terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper *et al.*, 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson *et al.*, 1994, Science 266: 776-779).

40

45

[0079] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde y libera los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin *et al.*, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina *et al.*, 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras *et al.*, 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton *et al.*, 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racieetal., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter *et al.*, 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

50

[0080] El progenitor se puede obtener de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenerse de" como se utiliza en este documento en relación con una fuente dada significará que el progenitor codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde el polinucleótido de la fuente se ha insertado. En un aspecto, el progenitor se secreta extracelularmente.

55

[0081] El progenitor puede ser una lipasa bacteriana. Por ejemplo, el progenitor puede ser un polipéptido bacteriano grampositivo, tal como una lipasa de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, o *Streptomyces*, o un polipéptido bacteriano gramnegativo, tal como una lipasa de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, o *Ureaplasma*.

60

[0082] En un aspecto, el progenitor es una lipasa de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*,

65

Bacillus licheniformis, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.

5 [0083] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0084] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans*.

10 [0085] El progenitor puede ser una lipasa fúngica. Por ejemplo, el progenitor puede ser una lipasa de levadura tal como una lipasa de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*; o una lipasa fúngica filamentosa tal como una lipasa de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*,
15 *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytilidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* o *Xylaria*.

20 [0086] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

25 [0087] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa 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*,
30 *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*,
35 *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spedenonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

40 [0088] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Humicola lanuginosa*, por ejemplo, la lipasa de la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

45 [0089] Se entiende que, para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que se conocen. Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

[0090] Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

55 [0091] El progenitor se puede identificar y obtener de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza, (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para el aislamiento de microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. Un polinucleótido que codifica un progenitor se puede obtener entonces mediante un filtrado de forma similar de una biblioteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado. Una vez que un polinucleótido que codifica un progenitor se ha detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son conocidas para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Composiciones

65 [0092] La composición detergente de la invención se obtiene por el método de obtención de una composición detergente de la invención. En una forma de realización, la invención se dirige a composiciones detergentes que comprenden variante de lipasa en combinación con uno o más componentes de composición de limpieza

adicionales. La elección de los componentes adicionales entra dentro de la habilidad del artesano e incluye ingredientes convencionales, que incluyen los componentes ejemplares no limitativos expuestos más adelante.

5 [0093] La elección de los componentes puede incluir, para aplicaciones de lavandería, la consideración del tipo de textil que se va a limpiar, el tipo y/o grado de suciedad, la temperatura en la que la limpieza va a ocurrir, y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados más adelante se categorizan por encabezado general según una funcionalidad particular, esto no se debe interpretar como una limitación, ya que un componente puede comprender funcionalidades adicionales como será apreciado por el artesano experto.

10 Enzimas

[0094] En una forma de realización, la variante de lipasa usada de acuerdo con el método de la invención se puede adicionar a una composición detergente en una cantidad que corresponde con 0,001-100 mg de proteína por litro de solución de lavado, tal como 0,01-100; 0,005-50; 0,01-25; 0,05-10; 0,05-5; o 0,01-1 mg de proteína por litro de solución de lavado. Asimismo, la variante de lipasa se puede adicionar a una composición detergente en una cantidad que corresponde con 0,001-1000 mg de proteína por g de detergente, tal como 0,01-1000; 0,005-500; 0,01-250; 0,05-100; 0,05-50; 0,01-10; o 0,02-2 mg de proteína por g de detergente.

20 [0095] La composición detergente puede comprender además una o más enzimas adicionales tales como proteasa, lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o peroxidasa.

25 [0096] En general las propiedades de la totalidad de la(s) enzima(s) comprendida(s), es decir la(s) variante(s) de lipasa al igual que las enzimas adicionales deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces. En una forma de realización de la presente invención, la(s) enzima(s) usada(s) de acuerdo con el método de la invención se puede(n) adicionar a una composición detergente en una cantidad que corresponde con 0,001-100 mg de proteína por litro de solución de lavado, tal como 0,01-100; 0,005-50; 0,01-25; 0,05-10; 0,05-5; o 0,01-1 mg de proteína por litro de solución de lavado. Asimismo, la(s) enzima(s) se puede(n) adicionar a una composición detergente en una cantidad que corresponde con 0,001-1000 mg de proteína por g de detergente, tal como 0,01-1000; 0,005-500; 0,01-250; 0,05-100; 0,05-50; 0,01-10; o 0,02-2 mg de proteína por g de detergente.

35 [0097] La(s) enzima(s) se puede(n) estabilizar utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol (1,2-propanediol), glicerol, sorbitol, hexilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenilborónico o un péptido aldehído; preferiblemente un tri o tetrapéptido aldehído, potencialmente como su aducto de hidrosulfito, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO92/19709 y WO92/19708.

40 [0098] Celulasas: las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente o diseñados genéticamente de proteína. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US4,435,307, US5,648,263, US5,691,178, US5,776,757 y WO89/09259.

50 [0099] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP0495257, EP0531372, WO96/11262, WO96/29397, WO98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO94/07998, EP0531315, US5,457,046, US5,686,593, US5,763,254, WO95/24471, WO98/12307 y PCT/DK98/00299.

55 [0100] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™, y Carezyme™ Endolase; Celluclean, (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

60 [0101] Proteasas: las proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen los mutantes modificados químicamente o diseñados genéticamente de proteína. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en WO89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO89/06270 y WO94/25583.

[0102] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO92/19729, WO98/20115, WO98/20116 y WO98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.

5 [0103] Las enzimas proteásicas disponibles comercialmente preferidas incluyen Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™, Kannase™, Liqunase™, Everlase™, Durazym™, Ovozyme™, Coronase™, Relase™, Polarzyme™, Blaze™, Neutrasa (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, Opticlean™, Purafect Ox™, Purafact Prime™, Excellase™ FN2™, y FN3™ FN4™ (Genencor International Inc.). Otros ejemplos son Primase™ y Duralase™. Blap R, Blap S y BlapX
10 disponibles de Henkel.

[0104] Lipasas y cutinasas: las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen las enzimas mutantes modificadas químicamente o diseñadas genéticamente de proteína. Ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo, de *T. lanuginosus* (denominado previamente *Humicola lanuginosa*) como se describe en EP258068 y EP305216, cutinasa de *Humicola*, por ejemplo *H. insolens* (WO96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de estas ahora red denominadas *Burkholderia*), por ejemplo, *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP331376), cepa de *P. esp.* SD705 (WO95/06720 y WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), lipasas de *Streptomyces* de tipo GD5L (WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (US5389536), lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599), y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespiralis* (WO12/137147).
15
20

[0105] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, WO95/14783, WO95/30744, WO95/35381, WO95/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 y WO09/109500.
25

[0106] Los productos de lipasa comerciales preferidos incluyen Lipolase™, Lipex™, Lipolex™ y Lipoclean™ (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).
30

[0107] Otros ejemplos son lipasas a veces referidas como aciltransferasas o perhidrolasas, por ejemplo, aciltransferasas con homología a lipasa A de *Candida antarctica* (WO10/111143), aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279), y variantes de la perhidrolasa de *M. smegmatis*, en particular, la variante S54V usada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).
35

[0108] Amilasas: las amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente o diseñados genéticamente de proteína. Las amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839.
40

[0109] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO94/02597, WO94/18314, WO96/23873, y WO97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.
45

[0110] Las amilasas disponibles comercialmente son Stainzyme; Stainzyme Plus; Duramyl™, Termamyl™, Termamyl Ultra; Natalase, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).
50

[0111] Peroxidasas/oxidadas: las peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente o diseñados genéticamente de proteína. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas, como aquellas descritas en WO93/24618, WO95/10602 y WO98/15257.
55

[0112] Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

[0113] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, como un granulado, un líquido, un lodo, etc. Las formulaciones de aditivo detergente preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o lodos.
60

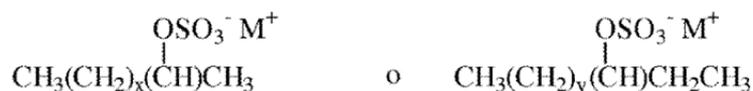
[0114] Los granulados no pulverulentos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en US4,106,991 y US4,661,452 y se pueden recubrir opcionalmente por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales
65

de recubrimiento ceroso son productos de poli(etileno óxido) (polietilenglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohólico contiene de 12 a 20 átomos de carbono y donde hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono y di y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento filmógenos adecuados para la aplicación mediante técnicas de lecho fluido se dan en GB1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas se pueden estabilizar, por ejemplo, añadiendo un poliol tal como propilenglicol, glicerol, sorbitol, un azúcar o alcohol de azúcar, sales, ácido láctico, ácido bórico, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenilborónico o un péptido aldehído; preferiblemente un tri o tetrapéptido aldehído, potencialmente como su aducto de hidrosulfito según métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP238216.

Surfactantes

[0115] La composición detergente de la invención comprende al menos un surfactante aniónico. En algunas formas de realización la composición puede comprender además uno o más surfactantes, que pueden ser, catiónicos, no iónicos, semipolares, zwitteriónicos, o cualquier mezcla de los mismos. En una forma de realización particular, la composición detergente incluye una mezcla de uno o más surfactantes aniónicos y uno o más surfactantes no iónicos. El surfactante (los surfactantes) está(n) típicamente presente(s) en un nivel total del 0,1 al aproximadamente 70 % en peso, tal como del 1 al aproximadamente 60 % en peso; del 2 al aproximadamente 50 % en peso; del 3 al aproximadamente 40 % en peso; del 4 al aproximadamente 30 % en peso; del 5 al aproximadamente 25 % en peso; o del 10 al aproximadamente 20 % en peso. El surfactante (los surfactantes) se elige(n) basándose en la aplicación de limpieza deseada, e incluye cualquier surfactante convencional conocido en la técnica. Cualquier surfactante conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar.

[0116] Los surfactantes aniónicos adecuados incluyen: sulfatos de alquilo; sulfonatos de alquilo; fosfatos de alquilo; fosfonatos de alquilo; carboxilatos de alquilo; y mezclas de los mismos. El surfactante aniónico se puede seleccionar del grupo que consiste en: sulfonatos de benceno de alquilo C10-C18 (LAS) preferiblemente sulfonatos de benceno de alquilo C10-C13; sulfatos de alquilo (AS) de cadena primaria ramificada, de cadena lineal y de cadena aleatoria C10-C20, típicamente con la fórmula siguiente: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{-OSO}_3^-\text{M}^+$, donde, M es hidrógeno o un catión que proporciona neutralidad de carga, cationes preferidos son cationes de sodio y amonio, donde x es un número entero de al menos 7, preferiblemente al menos 9; sulfatos de alquilo (2,3) secundarios C10-C18, típicamente con las fórmulas siguientes:



donde, M es hidrógeno o un catión que proporciona neutralidad de carga, los cationes incluyen cationes de sodio y amonio, donde x es un número entero de al menos 7, o al menos 9, y es un número entero de al menos 8, o al menos 9; carboxilatos de alcoxi de alquilo C10-C18; sulfatos de alquilo ramificado de cadena media como se describe con más detalle en US6,020,303 y US6,060,443; sulfonato de alquilbenceno modificado (MLAS) como se describe con más detalle en WO99/05243, WO99/05242, WO99/05244, WO99/05082, WO99/05084, WO99/05241, WO99/07656, WO00/23549, y WO00/23548; sulfonato de éster metílico (MES); sulfonato de alfa-olefina (AOS) y mezclas de los mismos.

[0117] Los surfactantes aniónicos incluyen: surfactantes de sulfonato de benceno de alquilo sustituido o no sustituido, lineal o ramificado, surfactantes de sulfonato de benceno de alquilo C8-C18 preferiblemente lineal; surfactantes de sulfato de benceno de alquilo lineal o ramificado, sustituido o no sustituido; surfactantes de sulfato de alquilo lineal o ramificado sustituido o no sustituido, que incluyen surfactantes de sulfato de alquilo C8-C18 lineal, surfactantes de sulfato de alquilo C8-C18 de alquilo ramificado C1-C3, surfactantes de sulfato de alquilo C8-C18 alcoxilado lineal o ramificado y mezclas de los mismos, surfactantes de sulfonato de alquilo lineal o ramificado sustituido o no sustituido; y mezclas de los mismos.

[0118] Los surfactantes de sulfato de alquilo alcoxilado pueden ser surfactantes de sulfato alcoxilado de alquilo C8-18 lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, con un grado medio de alcoxilación de 1 a 30, de 1 a 10, o de 3 a 7.

[0119] Los surfactantes aniónicos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: sulfatos de alquilo C12-18 lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos; alquilbencenosulfonatos C10-13 lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos, preferiblemente alquilbencenosulfonatos C10-13 lineales; y mezclas de los mismos. Altamente preferidos son los alquilbencenosulfonatos C10-13 lineales. Altamente preferidos son los alquilbencenosulfonatos C10-13 lineales, que son obtenibles, se obtienen preferiblemente, sulfonatando bencenos de alquilo lineales disponibles comercialmente (LAB); LAB adecuados incluyen 2- fenil LAB inferiores, tales como los suministrados por Sasol bajo el nombre comercial de Isochem(R) o aquellos suministrados por

Petresa bajo el nombre comercial de Petrelab (R), otros LAB adecuados incluyen 2-fenil LAB superiores, tales como los suministrados por Sasol bajo el nombre comercial de Hyblene (R). Un surfactante detergente aniónico adecuado es sulfonato de benceno de alquilo, que se obtiene por proceso catalizado DETAL, aunque otras vías de síntesis, tales como HF, también pueden ser adecuadas. Otro surfactante aniónico adecuado es etoxicarboxilato de alquilo.

[0120] Los surfactantes aniónicos están típicamente presentes en su forma de sal, típicamente formando un complejo con un catión adecuado. Los contraiones adecuados incluyen Na^+ y K^+ , amonio sustituido tal como alcanolamónio Ci-C_6 , preferiblemente monoetanolamina (MEA) trietanolamina (TEA), dietanolamina (DEA), y cualquier mezcla de los mismos. En algunas formas de realización, al menos el 20 % en peso, o al menos el 30 % en peso, o al menos el 40 % en peso, o al menos el 50 % en peso, o al menos el 60 % en peso, o al menos el 70 % en peso, o al menos el 80 % en peso, o incluso o al menos el 90 % en peso del surfactante aniónico se neutraliza por un catión de sodio.

[0121] El surfactante aniónico puede tener un índice hidrofílico (Hlc) de 8,0 a 9,1, o puede incluso tener un índice hidrofílico (Hlc) inferior, tal como uno en el rango de 6,0 a 8,0, o de 7,0 a menos de 8,0. El índice hidrofílico (Hlc) se describe con más detalle en WO00/27958.

[0122] El detergente normalmente contendrá del 0,1 al 70 % en peso, tal como del 1 al aproximadamente 60 % en peso; del 2 al aproximadamente 50 % en peso; del 3 al aproximadamente 40 % en peso; del 4 al aproximadamente 30 % en peso; del 5 al aproximadamente 25 % en peso; o del 10 al aproximadamente 20 % en peso de un surfactante aniónico. Ejemplos no limitativos de surfactantes aniónicos preferidos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), olefinsulfonatos, alquenosulfonatos, alcano-2,3-diil-bis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), etersulfatos de alcoholes (AES o AEOS o FES, también conocidos como etoxisulfatos de alcohol o sulfatos de éter de alcohol graso), alcanosulfonatos secundarios (SAS), parafinsulfonatos (PS), estersulfonatos, ésteres de ácidos grasos de glicerol sulfonatados, ésteres metílicos de ácidos grasos alfa-sulfonados (alfa-SFMe o SES) que incluyen sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil o alqueniilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfosuccínico o jabón, y combinaciones de los mismos.

[0123] Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá del 0,01 al aproximadamente 40 % en peso; tal como del 0,05 al aproximadamente 10 % en peso; del 0,1 al 5 % en peso de un surfactante catiónico. Ejemplos no limitativos de surfactantes catiónicos incluyen alquildimetiletanolamina cuat (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildistearilamonio (DSDMAC), y alquilbenzildimetilamonio, y combinaciones de los mismos, compuestos de amonio cuaternario de alquilo, amonio cuaternario alcoxilado (AQA).

[0124] Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá normalmente del 0,2 al aproximadamente 60 % en peso o incluso del 40 al aproximadamente 70 % en peso de un surfactante no iónico, por ejemplo del 0,5 al aproximadamente 40 % en peso, del 1 al aproximadamente 30 % en peso; del 1 al aproximadamente 20 % en peso, del 3 al aproximadamente 10 % en peso, del 2 al aproximadamente 5 % en peso, o del 6 al aproximadamente 15 % en peso. Ejemplos no limitativos de surfactantes no iónicos incluyen etoxilatos de alcohol (AE o AEO), propoxilatos de alcohol, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres de alquilo de ácidos grasos alcoxilados, tales como ésteres de alquilo de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilatos de alquilfenol, (mono) etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglucosidas (APG), aminas alcoxiladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FADA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamida de ácidos grasos propoxilados (PFAM), amidas de ácidos grasos de alquilo polihidroxi, o derivados N-alquilo N-acilo de glucosamina (glucamidas, GA, o glucamida de ácidos grasos, FAGA), al igual que productos disponibles bajo los nombres comerciales de SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

[0125] Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá normalmente del aproximadamente 0,1 al aproximadamente 40 % en peso de un surfactante semipolar, por ejemplo, del aproximadamente 0,5 al aproximadamente 30 % en peso, del aproximadamente 1 al aproximadamente 20 % en peso, del aproximadamente 3 al aproximadamente 10 % en peso, del aproximadamente 3 al aproximadamente 5 % en peso, o del aproximadamente 8 al aproximadamente 12 % en peso. Ejemplos no limitativos de surfactantes semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, óxido de *N*-(coco alquil)-*N,N*-dimetilamina y óxido de *N*-(sebo-alquil)-*N,N*-bis(2-hidroxi)etilamina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de los mismos.

[0126] Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá normalmente del aproximadamente 0,2 al aproximadamente 40 % en peso de un surfactante zwitteriónico, por ejemplo, del aproximadamente 0,5 al aproximadamente 30 % en peso, del aproximadamente 1 al aproximadamente 20 % en peso, del

aproximadamente 3 al aproximadamente 10 % en peso, del aproximadamente 3 al aproximadamente 5 % en peso, o del aproximadamente 8 al aproximadamente 12 % en peso. Ejemplos no limitativos de surfactantes zwitteriónicos incluyen betaína, alquildimetilbetaína, y sulfobetaína, y combinaciones de los mismos.

5 Hidrótopos

[0127] Un hidrótopo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas (u opuestamente, sustancias polares en un ambiente no polar). El uso de hidrótopos en composiciones detergentes permite, por ejemplo, formulaciones de surfactantes más concentradas (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos eliminando el agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como la separación de fase o alta viscosidad.

[0128] El detergente puede contener del 0 al aproximadamente 10 % en peso, tal como del 0,5 al aproximadamente 5 % en peso, o del 3 al aproximadamente 5 % en peso de un hidrótopo. Puede en algunos casos contener del 0 al aproximadamente 50 % en peso, tal como del 0 al aproximadamente 25 % en peso o del 25 al aproximadamente 50 % en peso de un hidrótopo. Cualquier hidrótopo conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. Ejemplos no limitativos de hidrótopos incluyen sulfonato de benceno de sodio, sulfonatos de p-tolueno de sodio (STS), sulfonatos de xileno de sodio (SXS), sulfonatos de cumeno de sodio (SCS), sulfonato de cimeno de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, sulfonato de hidroxinaftaleno de sodio, sulfato de etilhexilo de sodio, polioles y combinaciones de los mismos.

Constructores y coconstructores

[0129] La composición detergente puede contener del 0 al aproximadamente 65 % en peso o del 0 al aproximadamente 20 % en peso de constructor, coconstructor de detergente, o mezclas de los mismos. En un detergente para el lavado de la vajilla, el nivel de constructor es típicamente del 40 al aproximadamente 65 % en peso, o del 50 al aproximadamente 65 % en peso. El constructor y/o coconstructor puede particularmente ser un agente quelante que forma complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Cualquier constructor y/o coconstructor conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar.

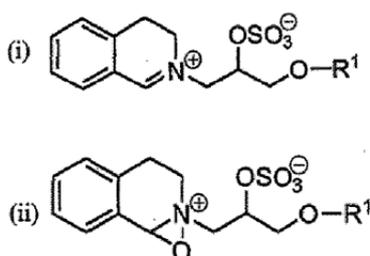
[0130] Ejemplos no limitativos de coconstructores incluyen zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos tales como trifosfato de sodio (STP o STPP), carbonatos tales como carbonato de sodio, silicatos solubles tales como metasilicato de sodio, silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), iminodietanol (DEA) y 2,2',2"-nitrilotrietanol (TEA), y carboximetilululina (CMI), y cualquier combinación de los mismos.

[0131] Ejemplos no limitativos de coconstructores incluyen homopolímeros de poliacrilatos o copolímeros de los mismos, tales como poli(ácido acrílico) (PAA) o copoli(ácido acrílico/ácido maleico) (PAA/PMA). Ejemplos no limitativos adicionales incluyen citrato, quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil o alqueniilsuccínico. Ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2"-nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinadiacético (MGDA), ácido glutámico-N,N-ácido diacético (GLDA), 1-hidroxietano-1,1-diilbis(ácido fosfónico) (HEDP), ácido etilendiaminptetrakis(metileno)tetrakis(fosfónico) (EDTMPA), ácido dietilentriaminopentakis(metileno)pentakis(fosfónico) (DTPMPA), ácido N-(2-hidroxietyl)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-N,N-ácido monoacético (ASMA), ácido aspártico N,N ácido diacético (ASDA), ácido aspártico-N,N ácido monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil) aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil) aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil) glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil) glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), α -alanina-N,N-ácido diacético (α -ALDA), serina-N,N-ácido diacético (SEDA), isoserina-N,N-ácido diacético (ISDA), fenilalanina-N,N-ácido diacético (PHDA), ácido antranílico N,N-ácido diacético (ANDA), ácido sulfanílico-N,N-ácido diacético (SLDA), taurina-N,N-ácido diacético (TUDA) y sulfometil-N,N-ácido diacético (SMDA), N-(hidroxietyl)-etilendiaminotriacetato (HEDTA), dietanoglicina (DEG), penta dietilentriamina (ácido metilfosfónico) (DTPMP), ácido aminotris(metilfosfónico) (ATMP), ácido pentaacético de dietilentriamina (DTPA) y cualquier combinación y sales de los mismos. Coconstructores y/o coconstructores ejemplares adicionales se describen en, por ejemplo, WO 09/102854, US 5977053.

Sistemas blanqueantes

[0132] El detergente puede contener del 0 al aproximadamente 50 % en peso, del 0,1 al aproximadamente 25 % en peso, del 0,5 al aproximadamente 20 % en peso, del 1 al aproximadamente 15 % en peso o del 2 al aproximadamente 10 % en peso de un sistema blanqueante. Cualquier sistema blanqueante conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. Los componentes del sistema blanqueante adecuados incluyen catalizadores blanqueantes, fotoblanqueadores, activadores de blanqueador, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio y perboratos de sodio, perácidos preformados y mezclas de los mismos. Los perácidos preformados adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, ácidos y sales peroxocarboxílicos, ácidos y sales percarbónicos, ácidos y sales perimidicos, ácidos y sales

peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone (R), y mezclas de los mismos. Ejemplos no limitativos de sistemas blanqueantes incluyen sistemas blanqueantes basados en peróxido, que pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, que incluye sales de metal alcalino tales como sales de sodio de perborato (normalmente mono o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persulfato, en combinación con un activador de blanqueador de formación de perácido. Por activador de blanqueador se entiende en este documento un compuesto que reacciona con blanqueador de peróxido como peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido así formado constituye el blanqueador activado. Los activadores de blanqueador adecuados para el uso en el mismo incluyen aquellos de la clase de ésteres amidas, imidas o anhídridos, ejemplos adecuados son diamina de tetracetilileno (TAED), 3,5,5 trimetil hexanoiloxibenzeno sulfonato de sodio, ácido dodecanoico de diperóxido, 4-(dodecanoiloxi)benzenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)benzenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(3,5,5-trimetilhexanoiloxi)benzenosulfonato (ISONOBS), tetraacetililenodiamina (TAED) y 4-(nonanoiloxi)benzenosulfonato (NOBS), y/o aquellos descritos en WO98/17767. Una familia particular de activadores de blanqueador de interés se describió en EP624154 y particularmente preferido en esa familia es el citrato de trietilo de acetilo (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como Triacin tiene la ventaja de que es respetuoso con el medio ambiente, ya que se degrada finalmente en ácido cítrico y alcohol. Además, el citrato de trietilo de acetilo y el triacetín tienen una buena estabilidad hidrolítica en el producto tras el almacenamiento y es un activador de blanqueador eficaz. Finalmente, el ATC proporciona una buena capacidad de construcción al aditivo de lavandería. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de, por ejemplo, el tipo amida, imida o sulfona. El sistema blanqueante también puede comprender perácidos tales como ácido 6-(ftaloilamino)percaprónico (PAP). El sistema blanqueante también puede incluir un catalizador de blanqueador. En algunas formas de realización del componente blanqueante puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos con las fórmulas siguientes:



(iii) y mezclas de los mismos; donde cada R^1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R^1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, isononilo, isodecilo, isotridecilo e isopentadecilo. Otros sistemas blanqueantes ejemplares se describen, por ejemplo, en WO07/087258, WO07/087244, WO07/087259, WO07/087242. Los fotoblanqueadores adecuados pueden ser, por ejemplo, ftalocianina de zinc sulfonada.

Polímeros

[0133] El detergente puede contener del 0 al aproximadamente 10 % en peso, tal como del 0,5 al aproximadamente 5 % en peso, del 2 al aproximadamente 5 % en peso, del 0,5 al aproximadamente 2 % en peso o del 0,2 al aproximadamente 1 % en peso de un polímero. Cualquier polímero conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. El polímero puede funcionar como un coconstructor como se ha mencionado anteriormente, o puede proporcionar propiedades de antirredeposición, protección de fibra, liberación de suciedad, inhibición de transferencia de tinte, limpieza de grasa y/o antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades anteriormente mencionadas y/o más de uno de los motivos mencionados más adelante.

[0134] Polímeros ejemplares incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), poli(alcohol vinílico) (PVA); poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno) (PEG), poli(etilenimina) etoxilada, inulina de carboximetilo (CMI), y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, ácido poliaspártico, y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico, CMC modificado hidrofóticamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de tereftalato de polietileno y tereftalato de polioxieteno (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(vinilpiridin-N-óxido) (PVPO o PVPNO) y vinilimidazol polivinilpirrolidona (PVPVI). Polímeros ejemplares adicionales incluyen policarboxilatos sulfonados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y etoxisulfato de dicuaternio. Otros polímeros ejemplares se describen en, por ejemplo, WO06/130575. Las sales de los polímeros anteriormente mencionados también se contemplan.

[0135] El polímero también puede ser un polímero de impulso de la surfactación. Los polímeros preferidos son polímeros de limpieza de grasa alcoxilados anfifílicos y/o copolímeros de injerto aleatorio. Los polímeros de

limpieza de grasa alcoxilados anfífilicos se refieren a cualquier polímero alcoxilado que tenga propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas equilibradas de manera que elimine las partículas de grasa de tejidos y superficies. Ejemplos de realización específicos de los polímeros de limpieza de grasa alcoxilados anfífilicos comprenden una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos alcoxilato fijados a esa estructura de núcleo. La estructura de núcleo puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en WO11/156297.

Tinte de agente de coloración de tejidos

[0136] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir tintes de agente de coloración de tejidos. Los agentes de coloración se formulan para depositarse sobre los tejidos desde la solución de lavado para mejorar la percepción de blancura del tejido. Los agentes blanqueadores fluorescentes emiten al menos alguna luz visible. En cambio, los agentes de coloración alteran el tinte de una superficie dado que absorben al menos una porción del espectro de luz visible. Los agentes de coloración adecuados incluyen tintes y conjugados de tinte-arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Los tintes adecuados incluyen tintes de molécula pequeña y tintes poliméricos. Los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en tintes bajo las clasificaciones del Índice de Colores (C.I.) de azul directo, rojo directo, violeta directo, azul ácido, rojo ácido, violeta ácido, azul básico, violeta básico y rojo básico, o mezclas de los mismos, por ejemplo, como se describe en WO05/03274, WO05/03275, WO05/03276 y EP1876226.

[0137] Preferiblemente el agente de coloración es azul o violeta. Se prefiere que el tinte (los tintes) de matización tenga(n) una absorción máxima de longitud de onda de 550 nm a 650 nm, preferiblemente de 570 nm a 630 nm. Una combinación de tintes que juntos tienen el efecto visual en el ojo humano como un único tinte que tiene una absorción máxima de longitud de onda en poliéster de 550 nm a 650 nm, preferiblemente de 570 nm a 630 nm. Esto se puede proporcionar, por ejemplo, mezclando un tinte rojo y azul verdoso para producir un matiz azul o violeta.

[0138] Ejemplos de tintes adecuados son violeta directo 7, violeta directo 9, violeta directo 11, violeta directo 26, violeta directo 31, violeta directo 35, violeta directo 40, violeta directo 41, violeta directo 51, violeta directo 66, violeta directo 99, violeta ácido 50, azul ácido 9, violeta ácido 17, negro ácido 1, rojo ácido 17, azul ácido 29, violeta solvente 13, violeta disperso 27 violeta disperso 26, violeta disperso 28, violeta disperso 63 y violeta disperso 77, azul básico 16, azul básico 65, azul básico 66, azul básico 67, azul básico 71, azul básico 159, violeta básico 19, violeta básico 35, violeta básico 38, violeta básica 48; azul básico 3, azul básico 75, azul básico 95, azul básico 122, azul básico 124, azul básico 141, tintes de tiazolio, azul reactivo 19, azul reactivo 163, azul reactivo 182, azul reactivo 96, Liquitint(R) Violet CT (Milliken, Spartanburg, EE.UU.) y Azo-CM-Celulose (Megazyme, Bray, República de Irlanda).

[0139] La composición detergente preferiblemente comprende del 0,00003 al aproximadamente 0,2 % en peso, del 0,00008 al aproximadamente 0,05 % en peso, o incluso del 0,0001 al aproximadamente 0,04 % en peso de agente de coloración de tejidos. La composición puede comprender del 0,0001 al 0,2 % en peso de tintes de agente de coloración de tejidos, esto se puede preferir especialmente cuando la composición es en forma de una bolsa de dosis unitaria. Los agentes de coloración adecuados también se describen en, por ejemplo, WO07/087257, WO07/087243.

Agente antiespumante

[0140] Las composiciones detergentes pueden comprender del 0,001 al aproximadamente 4,0 % en peso de antiespumante seleccionado de compuestos antiespumantes de silicona; compuestos antiespumantes de aceites de silicona y partículas hidrofóbicas; y mezclas de los mismos. En una forma de realización, las composiciones en este documento comprenden del 0,01 al aproximadamente 2,0 % en peso, o del 0,05 al aproximadamente 1,0 % en peso de antiespumante de silicona (porcentajes por cantidad activa sin incluir ningún portador). En una forma de realización, el antiespumante se selecciona de: polímeros de silicona modificada orgánica con sustituyentes de arilo o alquilarilo combinados con resina de silicona y sílice modificada; resinas M/Q; y mezclas de los mismos.

Cationes de calcio y magnesio

[0141] Preferiblemente, la composición comprende del 0,01 al 5,0 % en peso de cationes bivalentes, tales como cationes de calcio y/o magnesio. La composición puede comprender del 0,01 al 0,2 % en peso, del 0,2 al 1,0 % en peso, del 1,0 al 2,0 % en peso, del 2,0 al 3,0 % en peso, del 3,0 al 4,0 % en peso o del 4,0 al 5,0 % en peso.

Materiales complementarios

[0142] Cualquier componente detergente conocido en la técnica para el uso en detergentes también se puede utilizar. Otros componentes detergentes opcionales incluyen agentes anticorrosivos, agentes antiencogimiento,

agentes antirredeposición de suciedad, agentes antiarrugas, bactericidas, ligantes, inhibidores de corrosión, agentes desintegradores/de desintegración, tintes, estabilizadores enzimáticos que incluyen ácido bórico, boratos, CMC, inhibidores de proteasa tales como 4-FPBA y péptido aldehídos, y/o polioles tales como propilenglicol; glicerol, sorbitol y similares), acondicionadores de tejidos que incluyen arcillas, productos de relleno/ayudas de procesamiento, agentes de blanqueamiento fluorescentes/abrillantadores ópticos, impulsores de espuma, reguladores de (jabonadura) de espuma, perfumes, agentes suspensores de suciedad, suavizantes, supresores de jabonadura, inhibidores de pérdida de brillo, y agentes de mecha, bien solos o bien en combinación. Cualquier ingrediente conocido en la técnica para el uso en detergentes se puede utilizar. La elección de tales ingredientes entra dentro de la habilidad del artesano.

[0143] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden contener dispersantes. En particular, los detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Los materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen los ácidos homo o copoliméricos o sus sales, donde el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilos separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Los dispersantes adecuados se describen, por ejemplo, en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc.

[0144] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes de inhibición de transferencia de tinte. Los agentes poliméricos inhibidores de transferencia de tinte adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de n-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazola, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazolas o mezclas de los mismos. Cuando están presentes en una composición del sujeto, los agentes de inhibición de transferencia de tinte pueden estar presentes en niveles del 0,0001 al aproximadamente 10 % en peso, del 0,01 al aproximadamente 5 % en peso o del 0,1 al aproximadamente 3 % en peso de la composición.

[0145] Las composiciones detergentes de la presente invención preferiblemente también contendrán componentes adicionales que pueden teñir artículos que se estén limpiando, tales como agente de blanqueamiento fluorescente o abrillantadores ópticos. Cuando esté presente, el abrillantador está preferiblemente en un nivel del 0,01 al aproximadamente 0,5 % en peso. Cualquier agente de blanqueamiento fluorescente adecuado para el uso en una composición detergente para lavandería se puede utilizar en la composición de la presente invención. Los agentes blanqueadores fluorescentes usados más frecuentemente son aquellos que pertenecen a las clases de derivados de ácido diaminoestilbenosulfónico, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenil-distirilo. Ejemplos del tipo de derivado de ácido diaminoestilbenosulfónico de agentes blanqueadores fluorescentes incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triacin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triacin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(N-metil-N-2-hidroxi-etilamino)-s-triacin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(1-metil-2-hidroxi-etilamino)-s-triacin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato y 2-(estilbil-4"-nafto-1..2':4,5)-1,2,3-trizole-2"-sulfonato. Los agentes blanqueadores fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS, disponibles de Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica de 4,4'-bis-(2-morfolino-4 anilino-s-triacin-6-ilamino) estilbeno disulfonato. Tinopal CBS es la sal disódica de 2,2'-bis-(fenil-estiril) disulfonato. También preferidos son agentes de blanqueamiento fluorescentes es el disponible comercialmente Parawhite KX, suministrado por Paramount Minerals and Chemicals, Bombay, India. Otros fluorescentes adecuados para el uso en la invención incluyen las 1-3-diaril pirazolinas y las 7-alquilaminocumarinas. Los niveles de abrillantador fluorescente adecuados incluyen niveles inferiores del 0,01 % en peso, del 0,05 % en peso, del 0,1 % en peso o del 0,2 % en peso a niveles superiores del aproximadamente 0,5 % en peso o aproximadamente el 0,75 % en peso.

[0146] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más polímeros de liberación de suciedad que ayuden a la eliminación de suciedades de tejidos tales como algodón y tejidos a base de poliéster, en particular la eliminación de suciedades hidrofóbicas de tejidos a base de poliéster. Los polímeros de liberación de suciedad pueden ser, por ejemplo, polímeros a base de tereftalato no iónico o aniónico, caprolactama de polivinilo y copolímeros relativos, copolímeros de injerto de vinilo, poliamidas de poliéster, véase, por ejemplo, el capítulo 7 de Powdered Detergents, Surfactant science series, volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros de liberación de suciedad son polímeros de limpieza de grasa alcoxilados anfifílicos que comprenden una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos alcoxilato fijados a esa estructura de núcleo. La estructura de núcleo puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en WO09/087523. Además, los copolímeros de injerto aleatorio son polímeros de liberación de suciedad adecuados. Los copolímeros de injerto adecuados se describen con más detalle en WO07/138054, WO06/108856 y WO06/113314. Otros polímeros de liberación de suciedad son estructuras de polisacáridos sustituidas, especialmente estructuras de celulosa sustituidas tales como derivados de celulosa modificados tales como los descritos en EP1867808 o WO03/040279. Los polímeros de celulosa adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de los mismos. Los polímeros de celulosa adecuados incluyen celulosa modificada aniómicamente, celulosa modificada no iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada zwitteriónicamente, y mezclas de los mismos. Los polímeros de celulosa adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, éster de carboximetilcelulosa, y mezclas de los mismos.

[0147] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes antirredeposición tales como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido maleico, y polietilenoiminas etoxiladas. Los polímeros a base de celulosa descritos anteriormente bajo polímeros de liberación de suciedad también pueden funcionar como agentes antirredeposición.

[0148] Otros materiales complementarios adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, agentes antiencogimiento, agentes antiarrugas, bactericidas, ligantes, portadores, tintes, estabilizadores enzimáticos, suavizantes, productos de relleno, reguladores de espuma, hidrótrofos, perfumes, pigmentos, supresores de gleba, solventes, y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes elastizantes estructurales.

Uso

[0149] Uso en detergentes. Las variantes de lipasas usadas de acuerdo con el método de la invención se pueden utilizar para preparar composiciones detergentes estabilizadas. Por consiguiente, la presente invención se refiere a métodos de obtención de una composición detergente que comprende la introducción (a) de una variante de lipasa de una lipasa progenitora, variante que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2, una sustitución en una posición que corresponde con T231R+N233R y D254STNYHQ del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 y tiene actividad lipásica y (b) de un surfactante aniónico, donde dicha composición tiene estabilidad aumentada en comparación con una composición correspondiente que comprende la lipasa progenitora.

[0150] La estabilidad puede limitarse, pero no lo está, a ser monitoreada por tiempo real o estabilidad de almacenamiento acelerada y/o ensayos de DSC como se describe en este documento. Se pueden adicionar y convertirse así en un componente de una composición detergente. La composición detergente puede estar en cualquier forma adecuada, que incluye granulado, líquido, gel, pasta, barra de jabón, dosis/cápsula unitaria, etc. o cualquier combinación de las mismas.

[0151] La composición detergente de la presente invención se puede formular, por ejemplo, como una composición detergente de lavandería a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo de lavandería adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante de tejido de enjuague adicionada, o formularse como una composición detergente para el uso en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o formularse para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

[0152] La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes que no deberían interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

[0153] La termoestabilidad de las lipasas se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro de barrido diferencial VP-Capillary (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.). La temperatura de desnaturalización térmica, T_d (°C), se tomó como la cúspide del valor máximo de desnaturalización (mayor valor máximo endotérmico) en termogramas (C_p vs. T) obtenido después de calentar soluciones enzimáticas en el tampón (50 mM de tampón HEPES pH 8,0 con o sin 1 mM de CaCl₂ adicionado) a un ritmo de calentamiento programado constante de 200 K/hora.

[0154] Las soluciones de muestra y de referencia (aproximadamente 0,2 ml) se cargaron en el calorímetro (referencia: tampón sin enzima) de condiciones de almacenamiento a 10 °C y se preequilibraron térmicamente durante 20 minutos a 20 °C antes del escaneo de DSC de 20 °C a 110 °C. Las temperaturas de desnaturalización se determinaron con una exactitud de aproximadamente +/- 1 °C.

Ejemplo 2a: Ensayo de estabilidad de almacenamiento a tiempo real

[0155] La lipasa purificada se diluyó con tampón HSB (2,5 mM de HEPES pH 7; 10 M de NaCl; 0,02 % de Brij-35) a una concentración de 100 ppm. 20 microlitros de la solución de lipasa de 100 ppm se añadieron a una composición detergente de 180 microlitros, se agitaron durante 5 minutos y se sellaron. Las muestras se almacenaron a 4 °C (no estresadas) y 35 °C (estresadas). Los tiempos de almacenamiento se eligieron según la semivida de la referencia de lipasa.

[0156] Después del almacenamiento, se recogió el posible líquido de condensación por centrifugación. 10 microlitros de partes alícuotas de muestra se diluyeron 200 veces en 0,05 M de tampón de borato pH 9 (9 mM de CaCl₂, 0,0225 % de Brij-35, 0,85 % de 4-FBPA (31,5 g/l)). Una parte alícuota diluida se mezcló con cuatro partes

ES 2 680 145 T3

de 1 mM de pNP-palmitato, 1 mM de cloruro de calcio, 100 mM de Tris (pH 8,0), 6,5 mM de desoxicolato, 1,4 g/L de AOS y la liberación del pNP cromóforo se midió espectrofotométricamente durante 20 minutos.

5 [0157] La actividad residual se calculó como la proporción de las velocidades medidas de muestra estresada frente a muestra no estresada. El valor medio de la actividad residual se calculó basándose en de dos a cuatro repeticiones.

[0158] La semivida mostrada en los experimentos 6, 7 y 8 se calculó basándose en la fórmula siguiente:

10
$$\text{Semivida} = \text{tiempo de estrés} * \ln(0,5) / \ln(\text{actividad residual}).$$

[0159] El factor de mejora de la semivida (HIF) con respecto a una referencia de lipasa se calculó dividiendo la semivida de la lipasa con la semivida de la referencia de lipasa. La referencia de lipasa fue, a menos que se mencione de otro modo, una lipasa de *Thermomyces lanuginosus* que comprende las mutaciones T231R y N233R.

Tabla 1

Composición	D001 (% en peso)	D003 (% en peso)
Agua blanda	49 %	52 %
NaOH, gránulos	3 %	3 %
Ácido alquilsulfónico lineal (LAS)	12 %	-
Lauril éter sulfato de sodio (SLES) (70 %*)	-	8,4 %
Ácido graso de soja (Edenor SJ)	6 %	6 %
Ácido graso de coco (Radiacid 0631)	5 %	5 %
Etoxilato de alquilo C13AE8EO; (90 %*)	10 %	10 %
Amina de trietanol (99/90 %*)	2 %	2 %
Citrato de sodio, dihidrato	1 %	1 %
DTPMPA; ácido dietilentriaminopentakis(metilenfosfónico) (Dequest 2066 C2)	3 %	3 %
Propilenglicol	5 %	5 %
EtOH (99,9 %*)	5 %	5 %
Colorante	Adicionado	-
Opacificante (Syntran 5909, 35 % en peso*)	0,10 %	-
pH	8,4	8,4
Aniónico principal	LAS:jabón 1,2:1	SLES:jabón 1,2:1
AI/NI (incl. jabón)	2,3:1	2,3:1
AI/NI (excl. jabón)	1,2:1	1,2:1

* las cantidades se basan en los contenidos de sustancia seca reales.

20 [0160] D002 es un detergente comercial (Persil Small & Mighty nonbio, concentrado 2x) sin enzimas comprado en Reino Unido 2010. Se basa en LAS/SLES/NI y tiene pH 8,4 medido directamente.

Ejemplo 2b: Ensayo de estabilidad de almacenamiento a tiempo real en presencia de surfactantes aniónicos.

25 [0161] Un sistema de ensayo simple se configuró para evaluar la estabilidad en presencia de un surfactante aniónico tal como LAS.

Tabla 2

Composición	X001	X002	X013
LAS	11,1 %	11,1 %	-
TRIS	22,2 mM	22,2 mM	22,2 mM
NaCl	111,1 mM	111,1 mM	111,1 mM
pH	7	9	7

30 [0162] La lipasa purificada se diluyó con tampón HSB (2,5 mM de HEPES pH 7, 10 mM de NaCl; 0,02 % de Brij-35) a una concentración de 100 ppm. 20 microlitros de la solución de lipasa de 100 ppm se añadieron a una solución tamponada de 180 microlitros, se agitaron durante 5 minutos y se sellaron. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente en un tampón de referencia X013 sin surfactantes (no estresadas) y en un tampón con surfactantes X001 o X002 (estresadas). Las partes alícuotas de las muestras de cuatro repeticiones se tomaron después de 1, 2, 3, 4, 6, 24 y 48 horas.

35 [0163] Después del almacenamiento, el posible líquido de condensación se recogió por centrifugación. 10 microlitros de partes alícuotas de muestra se diluyeron 200 veces en 0,05 M de tampón de borato pH 9 (9 mM de

CaCl₂, 0,0225 % de Brij-35, 0,85 % de 4-FBPA (31,5 g/l)). Una parte alícuota diluida se mezcló con cuatro partes de 1 mM de pNP-palmitato, 1 mM de cloruro de calcio, 100 mM de Tris (pH 8,0), 6,5 mM de desoxicolato, 1,4 g/L de AOS y la liberación del pNP cromóforo se midió espectrofotométricamente durante 20 minutos.

5 [0164] La actividad residual se calculó como la proporción de las velocidades medidas de las muestras estresadas frente a las muestras no estresadas. El valor medio de la actividad residual se calculó basándose en de dos a cuatro repeticiones.

10 [0165] La semivida se calculó ajustando una curva del tipo $y = A \cdot 2^{-(x/B)}$ donde y es la actividad residual y x es el periodo de incubación. El valor óptimo de B es entonces la semivida. El ajuste se hace utilizando la función nls en R (<http://www.r-project.org>).

Ejemplo 2c: Ensayo de estabilidad de almacenamiento a tiempo real

15 [0166] La lipasa purificada en una solución madre de 2 mg EP/g se añadió al 96,3 % de detergente en una concentración de 68 ppm. Las muestras se agitaron durante mínimo 1 hora antes de la distribución en frascos de cristal sellados seguido de almacenamiento. Después del almacenamiento final, todas las muestras se congelaron y se analizaron para actividad residual y se compararon con una muestra de referencia que estaba congelada desde el inicio del experimento. La referencia de lipasa fue, a menos que se mencione de otro modo, una lipasa de *Thermomyces lanuginosus* que comprende las mutaciones T231R y N233R.

20 [0167] La actividad lipásica se midió mediante un método donde la enzima de lipasa se diluyó a 0,0145 - 0,0490 M:LCLU/L y se incubó (pH 8; 37 °C) con el sustrato PNP-palmitato; el PNP liberado se detectó espectrofotométricamente durante 65 segundos a 405 nm. La actividad absoluta se lee con respecto a una curva estándar. El valor medio de la actividad absoluta se calcula basándose en dos repeticiones.

25 [0168] La semivida se calculó ajustando una curva del tipo $y = A \cdot 2^{-(x/B)}$ donde y es la actividad residual y x es el tiempo de incubación. El valor óptimo de B es entonces la semivida. El ajuste se hace utilizando la función nls en R (<http://www.r-project.org>).

30 Ejemplo 3: Termoestabilidad

[0169] La termoestabilidad se determinó como se describe en el ejemplo 1 en ausencia de CaCl₂. La temperatura de desnaturalización térmica, T_d, en ausencia o presencia de LAS para una variante de lipasa sustituida D254S y su lipasa de referencia se muestra en la tabla 3.

Tabla 3

Mutaciones	Td (°C)	Td (L) + 0,5 mM de LAS (°C)
T231R +N233R	74,4	72,1
T231R +N233R +D254S	76,1	77,6

40 Ejemplo 4: Termoestabilidad

[0170] La termoestabilidad se determinó como se describe en el ejemplo 1 en presencia de CaCl₂. La temperatura de desnaturalización térmica, T_d, en ausencia o presencia de LAS para varias variantes de lipasa sustituida D254 y sus lipasas de referencia se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Mutaciones	Td (°C)	Td (L) + 0,5 mM LAS (°C)
N33Q +T231R +N233R	75,2	68,8
N33Q +T231R +N233R +D254S	76,3	79,3
N33Q +T231R +N233R +D254T	71,3	71,9
N33Q +T231R +N233R +D254N	72,6	72,9
N33Q +T231R +N233R +D254Y	69,6	68,4
N33Q +T231 R +N233R +D254H	69,4	68,3
N33Q +T231R +N233R +D254L	69,7	67,5
N33Q +T231R +N233R +D254Q	71,4	68,9

45 Ejemplo 5: Termoestabilidad

50 [0171] La termoestabilidad se determinó como se describe en el ejemplo 1. La temperatura de desnaturalización térmica, T_d, en ausencia o presencia de LAS y CaCl₂ para una variante de lipasa D254S se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

Mutaciones	Td (°C)	Td (L) +0,5 mM LAS (°C)	Td (L+C) +0,5 mM LAS +1mM CaCl2 (°C)
T231R +N233R +D254S	76,5	77,7	78,9

Ejemplo 6: Datos de estabilidad de almacenamiento a tiempo real

- 5 [0172] La estabilidad de almacenamiento se determinó en el detergente D001 como se describe en el ejemplo 2a. La actividad residual y el factor de mejora de semivida (HIF) de la variante de lipasa y su lipasa de referencia se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

Mutaciones	Actividad residual (%)	STDEV (%)	HIF
-	35	6	0,8
T231R +N233R	41	10	1,0
T231R +N233R +D254S	95	8	18,7
N33Q +T231R +N233R	36	0	0,9
N33Q +T231R +N233R +D254S	72	2	2,7

10

Ejemplo 7: Datos de estabilidad de almacenamiento a tiempo real

- 15 [0173] La estabilidad de almacenamiento se determinó en el detergente D001 como se describe en el ejemplo 2a. La actividad residual y el factor de mejora de la semivida (HIF) de la variante de lipasa y su lipasa de referencia se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Mutaciones	Actividad residual (%)	STDEV (%)	HIF
T231R +N233R	43	2	1,0
N33Q +T231R +N233R	32	2	0,7
N33Q +T231R +N233R +D254S	74	3	2,8

20

Ejemplo 8: Estabilidad en varios detergentes

- [0174] La estabilidad de almacenamiento se determinó en los detergentes D001, D002 y D003 como se describe en el ejemplo 2a. La semivida en horas de la variante de lipasa y su lipasa de referencia se muestran en la tabla 8.

25

Tabla 8

Mutación	D001	D002	D003
T231R +N233R	255	1131	613
T231R +N233R +D254S	2478	3716	1323

Ejemplo 9: Estabilidad en sistemas LAS

- 30 [0175] La estabilidad de almacenamiento después de 1, 2, 3, 4, 6, 24 y 48 horas se determinó en repeticiones de cuatro en los dos LAS que comprenden las composiciones: X001 y X002 a pH 7 y pH 9, respectivamente, como se describe en el ejemplo 2b. Las lipasas fueron estables en el tampón de referencia X013 durante el período de tiempo observado. La semivida en horas de la variante de lipasa y su lipasa de referencia se muestran en la tabla 9.

35

Tabla 9

Mutación	X001	X002
T231R +N233R	8,9	3,8
T231R +N233R +D254S	135,0	172,8
N33Q +T231R +N233R +D254S	136,0	251,2

Ejemplo 10: Datos de estabilidad de almacenamiento a tiempo real

- 40 [0176] La estabilidad de almacenamiento se determinó como se describe en el ejemplo 2c. La semivida en semanas y el factor de mejora de la semivida (HIF) de la variante de lipasa y su lipasa de referencia en el detergente D001, D002 y D003 a varias temperaturas se muestran en las tablas 10a, 10b y 10c, respectivamente.

Tabla 10a

Mutación	35 °C	37 °C	40 °C
T231R +N233R	1,2	0,7	0,2
T231R +N233R +D254S	6,5	4,4	1,6
HIF	5,3	6,4	10,1

Tabla 10b

Mutación	35 °C	37 °C	40 °C
T231R +N233R	6,2	5,8	3,2
T231R +N233R+D254S	13,2	16,7	12,3
HIF	2,1	2,9	3,8

Tabla 10c

Mutación	35 °C	37 °C	40 °C
T231R +N233R	1,7	1,2	0,5
T231R +N233R +D254S	2,2	1,9	1,2
HIF	1,3	1,6	2,3

Ejemplo 11: Estabilidad en los sistemas de surfactantes mezclados

- 10 [0177] La estabilidad de almacenamiento después de 19,25, 161,75 y 329,25 horas se determinaron en repeticiones de cuatro en las mezclas de detergente con surfactantes diferentes a pH diferente como se enumera en la tabla 11a. Las pruebas se hicieron como se describe en el ejemplo 2b, pero a las temperaturas de almacenamiento indicadas. Las lipasas fueron estables en el tampón de referencia X013 durante el período de tiempo evaluado. La semivida en horas de la variante de lipasa y su lipasa de referencia se muestran en la tabla 11b. El factor de mejora se muestra como la proporción de la semivida de la variante con la D254S mutación frente a sin ella.
- 15

Tabla 11a

	X002	X004	X005	X006	X010	X012
Na-LAS (%)	11,1	7,40	7,40	7,40	3,63	18,5
SLES (%)	-	-	-	-	3,63	-
Jabón* (%)	-	-	-	-	-	-
NI [no iónico]	-	3,63	3,63	3,63	3,63	9,2
Tris (mM)	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2
NaCl (mM)	111	111	111	111	111	111
Glicerol (%)	-	-	-	-	-	5,55
MPG (%)	-	-	-	-	-	-
EtOH (%)	-	-	-	-	-	-
Citrato (%)	-	-	-	-	-	-
DTPMP [Sistema constructor de fosfonato de ácido dietilentiainopenta(metilenfosfónico), Dequest 2066] (%)	-	-	-	-	-	-
pH	9,0	7,0	8,0	9,0	9,0	9,0
Proporción AI:NI	1:0	2:1	2:1	2:1	2:1	2:1
Total de adición de surfactantes (Na-LAS + SLES+NI) (%)	10	10	10	10	10	25

	X015	X016	X017	X018	X019	X020	X021
Na-LAS (%)	-	7,40	-	27,8	1,11	4,44	7,40
SLES (%)	-	-	11,1	-	6,33	-	-
Jabón (%)	7,40	-	-	-	-	-	-
NI [no iónico]	3,63	3,63	-	-	3,63	3,66	3,63
Tris (mM)	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2
NaCl (mM)	111	111	111	111	111	111	111
Glicerol (%)	5,55	-	-	-	-	-	-
MPG (%)	-	16,7	-	16,7	-	-	-
EtOH (%)	2,22	-	-	-	-	-	-
Citrato (%)	-	-	-	-	-	-	1,67
DTPMP	-	-	-	-	-	-	1,67

[Sistema constructor de fosfonato de ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico), Dequest 2066] (%)								
pH	9,0	8,0	9,5	8,0	9,0	9,0	8,0	
Proporción Al:NI	2:1	2:1	1:0	1:0	2:1	2:3	2:1	
Total de adición de surfactantes (Na-LAS + SLES+NI) (%)	10	10	10	25	10	10	10	

Tabla 11 b

Detergente	X002	X002	X004	X005	X006	X006	X010	X012
Temperatura de incubación	37	40	37	37	37	40	37	37
T231R+N233R	2,9	2,9	22,3	26,4	7,4	2,9	29,1	67,5
T231R+N233R+D254S	6,1	54,4	548,2	579,6	178,1	68,9	294,4	380,4
Factor de mejora	2	19	25	22	24	24	10	6

Detergente	X015	X016	X017	X018	X019	X020	X021
Temperatura de incubación	37	40	40	37	40	40	40
T231R+N233R	30,0	18,6	8,9	19,1	32,3	47,0	32,9
T231R+N233R+D254S	1250,0	655,6	514,0	255,9	927,8	1080,0	1445,3
Factor de mejora	42	35	58	13	29	23	44

5

Ejemplo 12: Rendimiento de lavado de lipasas después del almacenamiento en el detergente D001

[0178] La lipasa purificada se diluyó (50 mM de H₃BO₃/NaOH, 1 M de NaCl pH 9) a una concentración de 6,0 mg/mL. 0,25 mg de lipasa se añadieron a 5 g de detergente D001 (tabla 1), se agitaron durante 30 minutos y se sellaron. Las muestras se almacenaron a 37 °C (estresadas) durante 0 días, 7 días y 14 días y luego se transfirieron a -18 °C (no estresadas).

[0179] Después del almacenamiento, el rendimiento de lavado se midió a escala de laboratorio utilizando un método similar a ASTM D3050 (ASTM International, West Conshohocken, PA) con las modificaciones mencionadas en este documento. Porciones de ejemplo de prueba sucias (CS-10: algodón sucio con grasa de mantequilla y colorante, Center For Testmaterials) se lavaron en un Terg-O-tometer a 90 r.p.m. utilizando 1 L de solución detergente que contiene 5 g de detergente D001 y 0 mg o 0,25 mg de lipasa. Las porciones de ejemplo se lavaron a 30 °C usando dureza de agua artificial con 15°dH Ca⁺⁺/Mg⁺⁺/HCO₃⁻ (proporción 4:1:7,5) durante 15 minutos y luego se enjuagaron bajo agua del grifo corriente durante 10 minutos. Después de lavar y enjuagar, las porciones de ejemplo se secaron a temperatura ambiente durante toda la noche. La limpieza de las porciones de ejemplo se determinó mediante remisión de luz utilizando una medición de colorímetro de 460 nm (espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Colour Eye 7000) y los resultados se expresaron como ΔR por sustracción de la remisión del blanco, que se ha lavado con detergente sin enzima.

25

Tabla 12

Mutaciones	Tiempo de almacenamiento (días)	ΔR	Error típico	Actividad residual (%)
T231R+N233R	0	2,80	0,09	100
	7	2,10	0,15	75
	14	1,52	0,18	54
T231R+N233R+D254S	0	2,91	0,12	100
	7	2,73	0,14	94
	14	2,28	0,11	78

Listado de secuencias

[0180]

30

<110> Novozymes A/S
Borch, Kim
Malten, Marco
Mikkelsen, Lise Munch

35

Vind, Jesper Svendsen, Allan

<120> Composiciones detergentes

ES 2 680 145 T3

<130> 12315-WO-PCT

<160> 2

5 <170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 918

<212> ADN

10 <213> Thermomyces lanuginosus

<220>

15 <221> CDS

<222> (1)..(873)

<220>

<221> sig_peptide

20 <222> (1)..(66)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (67)..()

25 <400> 1

atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg 48
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

30 gcc agt cct att cgt cga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc 96
 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 -5 -1 1 5 10

35 aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat 144
 Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
 15 20 25

40 gat gcc cca gct ggt aca aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc 192
 Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 30 35 40

45 gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct 240
 Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 45 50 55

50 gga gtg ggc gat gtc acc ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa 288
 Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 60 65 70

55 ttg atc gtc ctc tct ttc cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc 336
 Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
 75 80 85 90

60 ggg aat ctt aac ttc gac ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc 384
 Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
 95 100 105

65 tgc agg gga cat gac ggc ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat 432
 Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 110 115 120

acg tta agg cag aag gtg gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat 480
 Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 125 130 135

cgc gtg gtg ttt acc gga cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt 528

ES 2 680 145 T3

	Arg	Val	Val	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	
	140						145					150					
5	gcc	gga	gca	gac	ctg	cgt	gga	aat	ggg	tat	gat	atc	gac	gtg	ttt	tca	576
	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Asp	Val	Phe	Ser	
	155					160					165					170	
10	tat	ggc	gcc	ccc	cga	gtc	gga	aac	agg	gct	ttt	gca	gaa	ttc	ctg	acc	624
	Tyr	Gly	Ala	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Phe	Leu	Thr	
					175					180					185		
15	gta	cag	acc	ggc	gga	aca	ctc	tac	cgc	att	acc	cac	acc	aat	gat	att	672
	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	His	Thr	Asn	Asp	Ile	
				190					195					200			
20	gtc	cct	aga	ctc	ccg	ccg	cgc	gaa	ttc	ggt	tac	agc	cat	tct	agc	cca	720
	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	Ser	Pro	
			205					210					215				
25	gag	tac	tgg	atc	aaa	tct	gga	acc	ctt	gtc	ccc	gtc	acc	cga	aac	gat	768
	Glu	Tyr	Trp	Ile	Lys	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	
	220						225					230					
30	atc	gtg	aag	ata	gaa	ggc	atc	gat	gcc	acc	ggc	ggc	aat	aac	cag	cct	816
	Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro	
	235					240					245					250	
35	aac	att	ccg	gat	atc	cct	gcg	cac	cta	tgg	tac	ttc	ggg	tta	att	ggg	864
	Asn	Ile	Pro	Asp	Ile	Pro	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ile	Gly	
					255					260					265		
40	aca	tgt	ctt	tagtggccgg	cgcggtggg	tccgactcta	gcgagctcga	gatct									918
	Thr	Cys	Leu														
45	Met	Arg	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Phe	Phe	Val	Ser	Ala	Trp	Thr	Ala	Leu	
			-20					-15					-10				
50	Ala	Ser	Pro	Ile	Arg	Arg	Glu	Val	Ser	Gln	Asp	Leu	Phe	Asn	Gln	Phe	
	-5				-1	1				5					10		
55	Asn	Leu	Phe	Ala	Gln	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ala	Tyr	Cys	Gly	Lys	Asn	Asn	
				15						20					25		
60	Asp	Ala	Pro	Ala	Gly	Thr	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Ala	Cys	Pro	
			30						35					40			
65	Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Phe	Glu	Asp	Ser	
			45					50					55				
70	Gly	Val	Gly	Asp	Val	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Leu	Asp	Asn	Thr	Asn	Lys	
	60						65					70					

ES 2 680 145 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de una composición detergente que comprende la introducción (a) de una variante de lipasa de una lipasa progenitora, variante que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2, una sustitución en una posición que corresponde con T231R+N233R y D254STNYHQ del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 y tiene actividad lipásica y (b) de un surfactante aniónico, donde dicha composición tiene estabilidad aumentada en comparación con una composición correspondiente que comprende la lipasa progenitora.
2. Método según la reivindicación 1, donde al menos un surfactante aniónico es alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), olefinsulfonatos, alquenosulfonatos, alcano-2,3-diil-bis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), etersulfatos de alcoholes (AES o AEOS o FES, conocidos también como etoxisulfatos de alcoholes o etersulfatos de alcoholes grasos), alcanosulfonatos secundarios (SAS), parafinsulfonatos (PS), estersulfonatos, ésteres de ácidos grasos de glicerol sulfonatados, ésteres metílicos de ácidos grasos alfa-sulfonados (alfa-SFMe o SES) que incluyen sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil o alqueniilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfosuccínico, jabón, o cualquier combinación de los mismos.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la variante de lipasa se selecciona del grupo que consiste en:
- un polipéptido que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2;
 - un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de baja astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) el complemento en toda su longitud de (i);
 - un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos el 60 % de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; y
 - un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, que tiene actividad lipásica.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la variante de lipasa tiene al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 %, pero menos del 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la variante de lipasa se codifica por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de media astringencia, condiciones de media alta astringencia, condiciones de alta astringencia, o condiciones de muy alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o (ii) el complemento en toda su longitud de (i).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el número de sustituciones es 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sustituciones.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además una sustitución en una posición que corresponde con la posición N33Q del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la variante de lipasa comprende o contiene sustituciones seleccionadas de:
- T231R +N233R +D254S;
 - N33Q +T231R +N233R +D254S;
 - T231R +N233R +D254T;
 - N33Q +T231R +N233R +D254T;
 - T231R +N233R +D254N;
 - N33Q +T231R +N233R +D254N;
 - T231R +N233R +D254Y;
 - N33Q +T231R +N233R +D254Y;
 - T231R +N233R +D254H;
 - N33Q + T231R +N233R +D254H;
 - T231R +N233R +D254Q; o
 - N33Q +T231R +N233R +D254Q.

ES 2 680 145 T3

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la lipasa progenitora comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.
- 5 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende además CaCl_2 .
11. Composición detergente obtenida por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 10 12. Método de limpieza que comprende un paso de distribución de la composición detergente según la reivindicación 11 a un objeto que se va a limpiar.