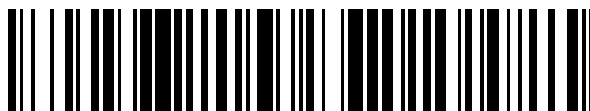


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 699**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2017 PCT/EP2017/055500**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.09.2017 WO17162440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2017 E 17709664 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.10.2021 EP 3433350**

54 Título: **Liposas para el uso en detergentes y productos de limpieza**

30 Prioridad:

23.03.2016 DE 102016204813

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

08.03.2022

73 Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)

Henkelstrasse 67

40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

HERBST, DANIELA;

O'CONNELL, TIMOTHY;

MUSSMANN, NINA;

EICHSTÄDT, RENÉE CHARLOTT;

LINDNER, CLAUDIA;

KÖRFER, GEORGETTE;

DAVARI DOLATABADI, MEHDI;

VOJCIC, LJUBICA y

SCHWANEBERG, ULRICH

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 898 699 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

Lipasas para el uso en detergentes y productos de limpieza

5 La invención se ubica en el campo de la tecnología de las enzimas. En particular, la invención se refiere a las lipasas, así como a su preparación, a su secuencia de aminoácidos que han sido modificados en particular, con vistas a su utilización en detergentes y productos de limpieza, a todas las lipasas suficientemente similares con una modificación correspondiente y a los ácidos nucleicos que las codifican. La invención también se refiere a procedimientos y usos de estas lipasas y a composiciones que las contienen, en particular, a detergentes y productos de limpieza.

10 Las lipasas se encuentran entre las enzimas más importantes desde el punto de vista técnico. Su uso en detergentes y productos de limpieza está establecido industrialmente y están presentes en prácticamente todos los detergentes y productos de limpieza modernos de alto rendimiento. Una lipasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces éster en sustratos lipídicos, especialmente grasas y aceites. Las lipasas representan, por tanto, un grupo de esterasas. 15 Las lipasas son enzimas generalmente versátiles que aceptan una variedad de sustratos, por ejemplo, ésteres alifáticos, alicíclicos, bicíclicos y aromáticos, tioésteres y aminas activadas. Las lipasas actúan contra los residuos de grasa en la ropa y catalizan su hidrólisis (lipólisis). Las lipasas con amplios espectros de sustrato se utilizan, en particular, cuando hay que convertir materias primas no homogéneas o mezclas de sustrato, es decir, por ejemplo, en detergentes y productos de limpieza, ya que la suciedad puede consistir en grasas y aceites con diferentes composiciones. Las lipasas utilizadas 20 en los detergentes y productos de limpieza conocidos en el estado de la técnica suelen ser de origen microbiano y suelen proceder de bacterias u hongos, por ejemplo, de los géneros *Thermomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Humicola*, *Trichoderma* o *Trichosporon*. Las lipasas suelen ser producidas por microorganismos adecuados según procesos biotecnológicos conocidos per se, por ejemplo, por huéspedes de expresión transgénica de los géneros *Bacillus* o por hongos filamentosos.

25 Por ejemplo, en la solicitud de patente alemana DE 102012224038 A1 y en la solicitud de patente internacional WO 2014/152674 se divulga una lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (SEC ID NO:2) destinada a detergentes y productos de limpieza. Se conocen otras lipasas para su uso en detergentes y productos de limpieza en los documentos US 2007/0179074 A1, WO 2007/087244 A2, WO2007/087503 A1 y WO 2006/084470 A2. En general, sólo las lipasas 30 seleccionadas son adecuadas para su uso en preparados tensioactivos líquidos. Muchas lipasas no muestran suficiente rendimiento catalítico o estabilidad en tales preparaciones. Sin embargo, el uso de lipasas después del proceso de lavado da lugar a un olor desagradable en los objetos lavados, especialmente en los textiles, porque la lipasa es absorbida por los textiles y además hidroliza los ésteres de ácidos grasos a ácidos grasos de bajo peso molecular. Estos ácidos grasos de bajo peso molecular se perciben entonces por su desagradable olor. La intensidad del olor puede variar debido a la 35 naturaleza del producto textil. Por lo tanto, para cada tipo de producto textil, es deseable encontrar una lipasa que presente un rendimiento de lavado suficiente y que, al mismo tiempo, produzca una mínima emisión de olores.

En consecuencia, las lipasas conocidas en el arte previo producen una emisión de olor en los productos textiles lavados. En particular, estas lipasas no están optimizadas para minimizar su emisión de olores en diferentes tejidos.

40 Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que una lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, o una lipasa suficientemente similar a ella (basada en la identidad de secuencia), que tiene al menos una sustitución de aminoácidos en la posición 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264, o 267, en cada caso referido a la numeración según SEC ID NO: 1, es especialmente adecuado para su uso en detergentes 45 o agentes de limpieza y produce una emisión reducida de olores, en particular, en textiles que contienen algodón y elastano.

Por lo tanto, en un primer aspecto, un objeto de la invención es una lipasa que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 1 50 sobre la longitud total de la misma y que tiene al menos una sustitución de aminoácidos en la posición 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1, en la que la sustitución de al menos un aminoácido se selecciona del grupo que consiste en 208N y 253N.

55 Otro objeto de la invención es un procedimiento para producir dicha lipasa que comprende la sustitución de al menos un aminoácido en al menos una posición correspondiente a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264, o 267 en la SEC ID NO:1 en una lipasa de partida que tenga al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 1 en toda su longitud, preferentemente de manera que la lipasa comprenda al menos una de las sustituciones de aminoácidos 60 P208N, P253N en al menos una posición. Una lipasa en el sentido de la presente solicitud de patente comprende, por tanto, tanto la lipasa como tal como una lipasa producida por un procedimiento de acuerdo con la invención. Por lo tanto, todas las declaraciones sobre la lipasa se refieren tanto a la lipasa como sustancia como a los procedimientos correspondientes, en particular, a los procedimientos de producción de la lipasa.

65 Como objetos adicionales de la invención, están asociadas las lipasas de acuerdo con la invención o los procedimientos de preparación de lipasas de acuerdo con la invención para los ácidos nucleicos que codifican estas lipasas, las lipasas

de acuerdo con la invención o las células huésped no humanas que contienen ácidos nucleicos, así como los agentes que comprenden lipasas de acuerdo con la invención, en particular, los detergentes y productos de limpieza, los procesos de lavado y limpieza, y los usos definidos a través de las lipasas de acuerdo con la invención.

5 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de los autores de la invención de que una alteración de acuerdo con la invención en al menos una de las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264, o 267 de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* según SEC ID NO: 1, en una lipasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO:1, de tal manera que un aminoácido diferente está presente en al menos una de las
10 posiciones correspondientes, resulta en una emisión de olor minimizada, en particular, en textiles que contienen algodón y elastano. Esto es particularmente sorprendente, ya que ninguna de las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente se ha asociado con una menor emisión de olor de la lipasa. Se encontraron efectos particularmente beneficiosos para las lipasas que tenían sustituciones en las posiciones 208, 211 o 253, especialmente 208N, 211N o 253N.

15 Las lipasas de acuerdo con la invención provocan una reducción de la emisión de olores en los textiles tras el proceso de lavado, por ejemplo, tras el lavado de textiles que contienen algodón y elastano. Esta ventaja es independiente de los tensioactivos y/o agentes blanqueadores utilizados, de las temperaturas de lavado empleadas, de las condiciones ácidas o alcalinas, de las condiciones de pH utilizadas, de los agentes desnaturalizantes u oxidantes y de la modificación de las relaciones redox. En consecuencia, las realizaciones particularmente preferidas de la invención proporcionan variantes de lipasa de rendimiento mejorado. Tales realizaciones ventajosas de las lipasas de acuerdo con la invención permiten, en consecuencia, mejorar los resultados de lavado en las suciedades sensibles a los lipolíticos y reducir la emisión de olores después del proceso de lavado.

20 En relación con la solicitud de patente alemana DE 102012224038 A1 y la solicitud de patente internacional WO 2014/152674 mencionada en la introducción, la presente invención es, por tanto, una modificación de secuencia alternativa que conduce a una reducción de la emisión de olores tras el lavado. Esto es sorprendente en el sentido de que la sustitución de al menos un aminoácido en la posición 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1, no se ha asociado previamente con la reducción de la emisión de olor de la lipasa.

Una lipasa de acuerdo con la invención exhibe una actividad enzimática, es decir, es capaz de hidrolizar grasas y aceites, en particular, en detergentes y productos de limpieza. Una lipasa de acuerdo con la invención es, por tanto, una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces éster en sustratos lipídicos y que, por tanto, es capaz de escindir grasas o aceites.
35 Además, una lipasa de acuerdo con la invención es preferentemente una lipasa madura, es decir, la molécula catalíticamente activa sin señal y/o propéptido(s). Salvo que se indique lo contrario, las secuencias indicadas se refieren también a las enzimas maduras (procesadas) en cada caso.

40 En varias realizaciones, la lipasa de acuerdo con la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en P208N y P253N, en cada caso referido a la numeración de acuerdo con SEC ID NO:1. En otras realizaciones preferidas, la lipasa de acuerdo con la invención comprende al menos dos o tres de las sustituciones de aminoácidos P208N, F211N, y P253N, cada una de ellas numerada con respecto a la numeración según la SEC ID NO:1.

45 En varias realizaciones, la lipasa de acuerdo con la invención comprende además las sustituciones de aminoácidos T231R y N233R, cada una de ellas numerada de acuerdo con la SEC ID NO:1. Estas sustituciones son conocidas en el estado de la técnica y están contenidas, por ejemplo, en la lipasa Lipex Evity 100 T ya disponible comercialmente.

50 En otra realización de la invención, la lipasa comprende una secuencia de aminoácidos que está relacionada con la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 1 a lo largo de su longitud total al menos el 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 % y 98,8 %, y que contiene, en al menos una de las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267 en el recuento según la
55 SEC NO: 1 tiene una sustitución de aminoácidos, en la que la al menos una sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo formado por 208N y 253N. En el contexto de la presente invención, la característica de que una lipasa tenga las sustituciones indicadas significa que contiene al menos un aminoácido no nativo en una de las posiciones correspondientes, preferentemente una de las mencionadas explícitamente, es decir, que no todas dichas posiciones están mutadas o eliminadas, por ejemplo, por fragmentación de la lipasa. Tales lipasas, que se prefieren de acuerdo con la invención, se dan en los números de identificación SEC:3-5.

60 La determinación de la identidad de las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se realiza mediante una comparación de secuencias. Esta comparación de secuencias se basa en el algoritmo BLAST establecido y utilizado habitualmente en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool". J. Mol. Biol. 215:403-410, y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST y PSI-BLAST:

una nueva generación de programas de búsqueda en bases de datos de proteínas"; Nucleic Acids Res., 25, pp.3389-3402) y se realiza básicamente mapeando secuencias similares de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos. Una asignación tabular de las posiciones relevantes se denomina alineación. Otro algoritmo disponible en la técnica anterior es el algoritmo FASTA. Las comparaciones de secuencias (alineamientos), en particular, las comparaciones de secuencias múltiples, se crean con programas informáticos. Se utilizan con frecuencia, por ejemplo, la serie Clustal (cf. por ejemplo Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (véase, por ejemplo, Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas basados en estos programas o algoritmos. Además, las comparaciones de secuencias (alineaciones) son posibles con el programa informático Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EE. UU.) con los parámetros estándar dados, cuyo módulo AlignX para las comparaciones de secuencias se basa en ClustalW.

Tal comparación también permite una declaración sobre la similitud de las secuencias comparadas entre sí. Suele expresarse en forma de porcentaje de identidad, es decir, la proporción de nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones o posiciones correspondientes entre sí en un alineamiento. En el caso de las secuencias de aminoácidos, el concepto más amplio de homología incluye los intercambios de aminoácidos conservados en la consideración, es decir, aminoácidos con actividad química similar, ya que éstos suelen ejercer actividades químicas similares dentro de la proteína. Por lo tanto, la similitud de las secuencias comparadas también puede indicarse como porcentaje de homología o porcentaje de similitud. Las declaraciones de identidad y/o homología pueden hacerse sobre polipéptidos o genes completos o sólo sobre regiones individuales. Por lo tanto, las regiones homólogas o idénticas de diferentes secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se definen por coincidencias en las secuencias. Estas regiones suelen tener funciones idénticas. Pueden ser pequeños y comprender sólo unos pocos nucleótidos o aminoácidos. A menudo, estas pequeñas regiones desempeñan funciones esenciales para la actividad global de la proteína. Por lo tanto, puede ser útil relacionar las coincidencias de secuencias sólo con regiones individuales, posiblemente pequeñas. Sin embargo, a menos que se indique lo contrario, los datos de identidad u homología en la presente solicitud se refieren a la longitud total de la secuencia de ácido nucleico o aminoácido indicada en cada caso.

En el contexto de la presente invención, indicar que una posición de aminoácido se corresponde con una posición designada numéricamente en la SEC ID NO:1 significa, en consecuencia, que la posición correspondiente está asociada con la posición designada numéricamente en la SEC ID NO:1 en un alineamiento como el definido anteriormente.

En otra realización de la invención, la lipasa se caracteriza porque su rendimiento de purificación no se reduce significativamente en comparación con el de una lipasa que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una de las secuencias de aminoácidos indicadas en los números SEC ID: 1-5, es decir, tiene al menos el 80 % del rendimiento de lavado de referencia. El rendimiento de limpieza puede determinarse en un sistema de lavado que contenga un detergente a una dosis entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de licor de lavado y la lipasa, en el que las lipasas a comparar se utilizan a la misma concentración (basada en la proteína activa) y el rendimiento de limpieza contra la suciedad en el algodón se determina midiendo el grado de limpieza de los textiles lavados. Por ejemplo, el proceso de lavado puede tener lugar durante 70 minutos a una temperatura de 40°C y el agua puede tener una dureza de entre 15,5 y 16,5° (dureza alemana). La concentración de lipasa en el detergente destinado a este sistema de lavado es de 0,001-0,1 % en peso, preferentemente de 0,01 a 0,06 % en peso, en base a proteína activa purificada.

Un detergente líquido preferido para dicho sistema de lavado está compuesto de la siguiente manera (todas las cantidades en porcentaje en peso): 7 % de ácido alquilbenceno sulfónico, 9 % de tensioactivos aniónicos, 4 % de sales Na C12-C18 de ácidos grasos, 7 % de tensioactivos no iónicos, 0,7 % de fosfonatos, 3,2 % de ácido cítrico, 3,0 % de NaOH, 0,04 % de antiespumante, 5,7 % de 1,2-pro- pandiol, 0,1 % de conservantes, 2 % de etanol, 0,2 % de inhibidor de la transferencia de colorantes, equilibrio de agua desmineralizada. Preferiblemente, la dosis del detergente líquido está entre 4,5 y 6,0 gramos por litro de licor de lavado, por ejemplo 4,7, 4,9 o 5,9 gramos por litro de licor de lavado. Preferiblemente, el lavado se lleva a cabo en un intervalo de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferiblemente entre pH 8 y pH 9.

En el contexto de la invención, la determinación del rendimiento de la limpieza se lleva a cabo a 40°C utilizando un detergente líquido como el indicado anteriormente, preferiblemente lavando durante 30 minutos.

El grado de blancura, es decir, el aclaramiento de la suciedad, como medida del rendimiento de la limpieza, se determina mediante procedimientos de medición ópticos, preferentemente fotométricos. Un dispositivo adecuado para este fin es, por ejemplo, el espectrómetro Minolta CM508d. Por lo general, los dispositivos utilizados para la medición se calibran previamente con un patrón blanco, preferiblemente un patrón blanco suministrado con el dispositivo.

El uso de la lipasa respectiva con la misma actividad asegura que las propiedades enzimáticas respectivas, por ejemplo, el rendimiento de limpieza sobre ciertos contaminantes, se comparan incluso si la proporción de sustancia activa a la proteína total (los valores de la actividad específica) difieren. En general, una baja actividad específica puede compensarse añadiendo una mayor cantidad de proteínas.

La actividad de la lipasa se determina de la manera habitual, preferiblemente como se describe en Bruno Stellmach, "Bestimmungsmethoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin" (Steinkopff Verlag Darmstadt, 1988, p. 172ff). En este procedimiento, las muestras que contienen lipasa se añaden a una emulsión

de aceite de oliva en agua que contiene emulsionantes y se incuban a 30°C y pH 9,0. Los ácidos grasos se liberan en el proceso. Se titulan continuamente con una solución de hidróxido de sodio 0,01 N durante 20 minutos utilizando un auto titulador para que el valor del pH se mantenga constante ("titulación pH-stat"). Sobre la base del consumo de hidróxido de sodio, la actividad de la lipasa se determina por referencia a una lipasa de referencia.

5 Una prueba alternativa para determinar la actividad lipolítica de las lipasas de acuerdo con la invención es un procedimiento de medición óptica, preferentemente un procedimiento fotométrico. La prueba adecuada para este fin consiste en la escisión dependiente de la lipasa del sustrato para-nitrofenol-butilato (pNP-butilato). Este es escindido por medio de la lipasa en para-nitrofenolato y butirato. La presencia de para-nitrofenolato puede determinarse utilizando un fotómetro, por ejemplo, el instrumento Tecan Sunrise y el software XFLUOR, a 405 nm, permitiendo así inferir la actividad enzimática de la lipasa.

15 En muchas realizaciones, la lipasa de acuerdo con la invención tiene una emisión de olor significativamente reducida en comparación con una lipasa según SEC ID NO:1 y/o una lipasa según SEC ID NO:2. "Significativo" en este contexto significa que la lipasa de acuerdo con la invención tiene como máximo el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de la intensidad de olor determinada para una lipasa según la SEC NO:1 y/o una lipasa según la SEC NO:2. En un procedimiento ejemplar para determinar la intensidad de los olores causados por las lipasas, los paños (los que a requerimiento pueden estar compuestos por diversos materiales como el algodón, el poliéster, la poliamida, la viscosa, el merilo y el elastano) se lavan con productos textiles en las condiciones mencionadas. A 20 continuación, los paños se conservan herméticamente en frascos de muestra hasta que un panel de probadores, denominado panel sensorial, determina su intensidad de olor.

25 La concentración de proteínas puede determinarse mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento BCA (ácido bicinchonínico; ácido 2,2'-biquinoil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento Biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), pp. 751-766). La concentración de proteína activa puede determinarse mediante la valoración de los sitios activos utilizando un inhibidor irreversible adecuado y la determinación de la actividad residual (cf. M. Bender et al. Bender et al., J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), pp. 5890-5913).

30 Las proteínas pueden agruparse en grupos de proteínas inmunológicamente relacionadas por reacción con un antisuero o un anticuerpo específico. Los miembros de dicho grupo se caracterizan por compartir el mismo determinante antigénico reconocido por un anticuerpo. Por lo tanto, son lo suficientemente similares entre sí desde el punto de vista estructural como para ser reconocidos por un antisuero o ciertos anticuerpos. Otro objeto de la invención es, por tanto, las lipasas que se caracterizan por tener al menos uno y cada vez más preferentemente dos, tres o cuatro determinantes antigénicos coincidentes con una lipasa de acuerdo con la invención. Dichas lipasas son estructuralmente tan similares a las lipasas de la invención debido a sus similitudes inmunológicas que también se puede suponer una función similar.

35 Además de los cambios de aminoácidos explicados anteriormente, las lipasas de acuerdo con la invención pueden presentar otros cambios de aminoácidos, en particular, sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. Dichas lipasas se desarrollan, por ejemplo, mediante modificaciones genéticas dirigidas, es decir, mediante procesos de mutagénesis, y se optimizan para fines específicos o con respecto a propiedades específicas (por ejemplo, con respecto a su actividad catalítica, estabilidad, etc.). Además, los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden introducirse en los enfoques de recombinación y utilizarse así para generar lipasas completamente nuevas u otros polipéptidos.

40 El objetivo es introducir mutaciones dirigidas, como sustituciones, inserciones o deleciones, en las moléculas conocidas para, por ejemplo, mejorar el rendimiento de purificación de las enzimas de acuerdo con la invención. Para ello, en particular, se pueden modificar las cargas superficiales y/o el punto isoeléctrico de las moléculas y, en consecuencia, sus interacciones con el sustrato. Por ejemplo, la carga neta de las enzimas puede modificarse para influir en la unión del sustrato, en particular, para su uso en detergentes y productos de limpieza. De manera alternativa o complementaria, la estabilidad de la lipasa puede aumentarse aún más mediante una o más mutaciones correspondientes, mejorando así su rendimiento de purificación. Las propiedades ventajosas de las mutaciones individuales, por ejemplo, las sustituciones individuales, pueden complementarse entre sí. Una lipasa ya optimizada con respecto a ciertas propiedades, por ejemplo, con respecto a su estabilidad a los tensioactivos y/o a los agentes blanqueadores y/o a otros componentes, puede por lo tanto ser desarrollados inicialmente dentro del ámbito de la invención.

45 El objetivo es introducir mutaciones dirigidas, como sustituciones, inserciones o deleciones, en las moléculas conocidas para, por ejemplo, mejorar el rendimiento de purificación de las enzimas de acuerdo con la invención. Para ello, en particular, se pueden modificar las cargas superficiales y/o el punto isoeléctrico de las moléculas y, en consecuencia, sus interacciones con el sustrato. Por ejemplo, la carga neta de las enzimas puede modificarse para influir en la unión del sustrato, en particular, para su uso en detergentes y productos de limpieza. De manera alternativa o complementaria, la estabilidad de la lipasa puede aumentarse aún más mediante una o más mutaciones correspondientes, mejorando así su rendimiento de purificación. Las propiedades ventajosas de las mutaciones individuales, por ejemplo, las sustituciones individuales, pueden complementarse entre sí. Una lipasa ya optimizada con respecto a ciertas propiedades, por ejemplo, con respecto a su estabilidad a los tensioactivos y/o a los agentes blanqueadores y/o a otros componentes, puede por lo tanto ser desarrollados inicialmente dentro del ámbito de la invención.

50 Para la descripción de las sustituciones que implican exactamente una posición de aminoácido (intercambios de aminoácidos), se utiliza la siguiente convención: en primer lugar, se designa el aminoácido presente de forma natural en la forma del código de una letra utilizado internacionalmente, seguido de la posición de la secuencia asociada y, por último, el aminoácido insertado. Las sustituciones múltiples dentro de la misma cadena de polipéptidos se separan con barras inclinadas. En el caso de las inserciones, los aminoácidos adicionales se nombran después de la posición de la secuencia.

55 En el caso de las supresiones, el aminoácido que falta se sustituye por un símbolo, por ejemplo, un asterisco o un guión, o se indica una A antes de la posición correspondiente. Por ejemplo, P208N describe la sustitución de prolina en la posición 95 por asparagina, P208PA describe la inserción de alanina después del aminoácido prolina en la posición 208, y P208* o AP208 describe la supresión de prolina en la posición 208. Esta nomenclatura es conocida por los especialistas en el arte de la tecnología enzimática.

65

Otro objeto de la invención es, por tanto, una lipasa que se caracteriza porque se puede obtener a partir de una lipasa como la descrita anteriormente como molécula de partida mediante una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, en la que la lipasa en el recuento según SEC ID NO. 1 todavía tiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la invención en las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264, o 267, preferentemente 208, 211 o 253, en la SEC ID NO:1, como se ha descrito anteriormente. El término "sustitución conservadora de aminoácidos" significa el intercambio (sustitución) de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido, cuyo intercambio no da lugar a un cambio de polaridad o carga en la posición del aminoácido intercambiado, por ejemplo, el intercambio de un residuo de aminoácido no polar por otro residuo de aminoácido no polar. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras en el contexto de la invención incluyen, por ejemplo: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

De forma alternativa o complementaria, la lipasa se caracteriza porque puede obtenerse a partir de una lipasa de la invención como molécula de partida por mutagénesis de fragmentación, delección, inserción o sustitución y comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 o 269 aminoácidos contiguos a la molécula madre, en la que el al menos un residuo de aminoácido mutado contenido en la molécula madre sigue estando presente en las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, preferentemente 208, 211 o 253, en la SEC ID NO: 1, sigue presente.

Por ejemplo, es posible eliminar aminoácidos individuales en los extremos o en los bucles de la enzima sin pérdida o reducción de la actividad lipolítica. Además, esta mutagénesis de fragmentación, delección, inserción o sustitución puede, por ejemplo, reducir la alergenicidad de las enzimas en cuestión y, en consecuencia, mejorar su utilidad general. Ventajosamente, las enzimas conservan su actividad lipolítica incluso después de la mutagénesis, es decir, su actividad lipolítica corresponde al menos a la de la enzima madre, es decir, en una realización preferida la actividad lipolítica es al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 % de la actividad de la enzima madre. Otras sustituciones también pueden tener efectos beneficiosos. Tanto los aminoácidos simples como los múltiples contiguos pueden ser intercambiados por otros aminoácidos.

De modo alternativo o complementario, la lipasa se caracteriza porque se puede obtener a partir de una lipasa de acuerdo con la invención como molécula de partida mediante una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, donde la lipasa tiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, según la SEC ID NO: 1, preferentemente con al menos una de las sustituciones P208N, F211N o P253N.

En otras realizaciones, la lipasa se caracteriza porque se puede obtener a partir de una lipasa de la invención como molécula de partida por fragmentación, delección, inserción o mutagénesis de sustitución y comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 o 269 aminoácidos contiguos a dicha molécula madre, comprendiendo dicha lipasa al menos una de dichas sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, según la SEC ID NO: 1 en el que la sustitución de al menos un aminoácido se selecciona del grupo formado por 208N y 253N.

Las posiciones de aminoácidos adicionales se definen en el presente documento mediante una alineación de la secuencia de aminoácidos de una lipasa de acuerdo con la invención con la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, tal como se indica en la SEC ID NO:1. Además, la asignación de posiciones se basa en la proteína madura (maduro). En particular, esta asignación también es aplicable si la secuencia de aminoácidos de una lipasa de acuerdo con la invención comprende un mayor número de residuos de aminoácidos que la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* según la SEC ID NO:1. Basándose en dichas posiciones en la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, las posiciones de modificación en una lipasa de acuerdo con la invención son las que se asignan a estas mismas posiciones en un alineamiento.

A las posiciones ventajosas para cambios de secuencia, en particular, sustituciones, de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, que son de importancia preferente cuando se transfieren a posiciones homólogas de las lipasas de acuerdo con la invención y confieren propiedades funcionales ventajosas a la lipasa deben asignarse, por lo tanto, a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267 en una alineación con SEC ID NO: 1 y, por tanto, en el recuento según la SEC ID NO:1. Los siguientes residuos de aminoácidos se encuentran en las posiciones mencionadas en la molécula de tipo salvaje de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*: S83, I86, E87, W89, I90, N92, L93, F95, F113, P174, I202, V203, R205, L206, P207, P208, R209, F211, L227, I252, P253, P256, H258, L259, W260, L264 y T267.

Una confirmación adicional de la asignación correcta de los aminoácidos que deben cambiarse, es decir, en particular, su correspondencia funcional, puede proporcionarse mediante ensayos comparativos, según los cuales las dos posiciones asignadas entre sí sobre la base de un alineamiento se cambian de la misma manera en ambas lipasas comparadas entre sí y se observa si la actividad enzimática se cambia de la misma manera en ambas. Si, por ejemplo, un intercambio de aminoácidos en una determinada posición de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* según la SEC ID NO:1 va

acompañado de un cambio en un parámetro enzimático, por ejemplo, un aumento del valor de KM, y si se observa un cambio correspondiente en el parámetro enzimático, por ejemplo, igualmente un aumento del valor de KM, en una variante de la lipasa de acuerdo con la invención, cuyo intercambio de aminoácidos se logró mediante el mismo aminoácido introducido, esto debe considerarse una confirmación de la asignación correcta.

5

Todos los hechos anteriores también pueden aplicarse a los procedimientos para producir una lipasa de acuerdo con la invención. En consecuencia, un proceso de acuerdo con la invención comprende además uno o más de los siguientes pasos de procedimiento:

10

(a) introducir una sustitución de aminoácidos conservadora única o múltiple, en la que la lipasa comprende al menos una sustitución de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 y 267 según la SEC ID NO: 1, siendo que la sustitución de al menos un aminoácido se seleccionó del grupo formado por 208N y 253N;

15

b) modificar la secuencia de aminoácidos mediante mutagénesis de fragmentación, delección, inserción o sustitución, de manera que la lipasa comprenda una secuencia de aminoácidos contigua en una longitud de al menos 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 o 269 aminoácidos contiguos a la molécula madre, siendo que dicha lipasa comprende al menos una sustitución de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 y 267 según la SEC ID NO: 1, en el que la sustitución de al menos un aminoácido se selecciona del grupo formado por 208N y 253N.

20

En varias realizaciones del procedimiento de preparación, la lipasa de acuerdo con la invención comprende además sustituciones de aminoácidos T231R y/o N233R, cada una de ellas relativa a la numeración según la SEC ID NO:1. Preferiblemente, estas sustituciones están presentes y se combinan con al menos una de las sustituciones aquí divulgadas.

25

Todas las afirmaciones hechas anteriormente en relación con las lipasas se aplican también a los procedimientos de acuerdo con la invención.

30

En otras realizaciones de la invención, la lipasa de acuerdo con la invención o la lipasa producida por medio de un procedimiento de acuerdo con la invención es todavía al menos del 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 % o 98,8 % idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID NO: 1 sobre su longitud total. Alternativamente, la lipasa de acuerdo con la invención o la lipasa producida por un procedimiento de acuerdo con la invención es todavía de al menos 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 % o 98 % idénticas a una de las secuencias de aminoácidos que figuran en los números SEC ID: 2-5 sobre su longitud total. La lipasa o la lipasa producida mediante un procedimiento de acuerdo con la invención tiene al menos una sustitución de aminoácidos en las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, en cada caso basado en la numeración según la SEC NO: 1, en el que la sustitución de al menos un aminoácido se selecciona del grupo formado por 208N y 253N, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1. En las realizaciones de acuerdo con la invención.

35

40

45

En las realizaciones, la lipasa comprende dos de las sustituciones de aminoácidos P208N, y P253N. Otro objeto de la invención es una lipasa antes descrita que adicionalmente está estabilizada, en particular, mediante una o varias mutaciones, por ejemplo, sustituciones, o mediante el acoplamiento a un polímero. Esto se debe a que el aumento de la estabilidad durante el almacenamiento y/o durante el uso, por ejemplo, en el proceso de lavado, hace que la actividad enzimática dure más tiempo y, debido a ello mejore el rendimiento de la limpieza. En principio, se pueden considerar todas las posibilidades de estabilización descritas y/o útiles en el arte previo. Se prefieren las estabilizaciones que se consiguen mediante mutaciones de la propia enzima, ya que dichas estabilizaciones no requieren ninguna otra etapa de trabajo tras la recuperación de la enzima. Más arriba se ofrecen ejemplos de cambios de secuencia adecuados. Otras modificaciones adecuadas de la secuencia son conocidas en la técnica anterior.

50

Las posibilidades de estabilización son, por ejemplo:

55

- Protección contra la influencia de agentes desnaturalizantes, como los tensioactivos, mediante mutaciones que provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos en la superficie de la proteína o sobre ella;
- Sustitución de los aminoácidos que están cerca del N-terminal por aquellos que pueden entrar en contacto con el resto de la molécula mediante interacciones no covalentes, contribuyendo así al mantenimiento de la estructura globular.

60

Las realizaciones preferidas son aquellas en las que la enzima se estabiliza de múltiples maneras, ya que las múltiples mutaciones estabilizadoras actúan de forma aditiva o sinérgica.

65

Otro objeto de la invención es una lipasa como la descrita anteriormente, caracterizada porque tiene al menos una modificación química. Una lipasa con una modificación de este tipo se denomina derivada, es decir, la lipasa está derivada.

En consecuencia, a los efectos de la presente solicitud, se entiende que los derivados son proteínas cuya cadena de aminoácidos pura ha sido modificada químicamente. Dicha derivación puede tener lugar, por ejemplo, in vivo por la célula huésped que expresa la proteína. En este sentido, destacan los acoplamientos de compuestos poco moleculares, como los lípidos o los oligosacáridos. Sin embargo, la derivatización también puede llevarse a cabo in vitro, por ejemplo, mediante la conversión química de una cadena lateral de un aminoácido o mediante la unión covalente de otro compuesto a la proteína. Por ejemplo, es posible el acoplamiento de aminas a los grupos carboxilo de una enzima para cambiar el punto isoelectrónico. Este otro compuesto también puede ser otra proteína, por ejemplo, unida a una proteína de la invención a través de compuestos químicos bifuncionales. Asimismo, por derivación debe entenderse la unión covalente a un soporte macromolecular, o también la inclusión no covalente en estructuras de jaula macromoleculares adecuadas. La derivatización puede, por ejemplo, influir en la especificidad del sustrato o en la fuerza de unión al sustrato o provocar un bloqueo temporal de la actividad enzimática si la sustancia acoplada es un inhibidor. Esto puede ser útil, por ejemplo, para el período de almacenamiento. Estas modificaciones pueden influir aún más en la estabilidad o la actividad enzimática. También pueden servir para reducir la alergenicidad y/o la inmunogenicidad de la proteína y aumentar así su tolerancia cutánea, por ejemplo. Por ejemplo, los acoplamientos con compuestos macromoleculares, como el polietilenglicol, pueden mejorar la proteína en términos de estabilidad y/o tolerancia cutánea.

Los derivados de una proteína de acuerdo con la invención también pueden entenderse en el sentido más amplio como preparaciones de estas proteínas. Dependiendo de la extracción, el procesamiento o la preparación, una proteína puede estar asociada con otras sustancias diversas, por ejemplo, del cultivo de los microorganismos productores. Una proteína también puede haber sido mezclada deliberadamente con otras sustancias, por ejemplo, para aumentar su estabilidad de almacenamiento. Por lo tanto, todas las preparaciones de una proteína de acuerdo con la invención son también de acuerdo con la invención. Esto también es independiente de si realmente desarrolla esta actividad enzimática en una preparación concreta. Ya que se puede desear que no tenga ninguna o poca actividad durante el almacenamiento y que sólo desarrolle su función enzimática en el momento del uso. Esto puede controlarse, por ejemplo, con sustancias de acompañamiento adecuadas. En este sentido, es posible la preparación conjunta de lipasas con inhibidores específicos.

Con respecto a todas las lipasas o variantes y/o derivados de las lipasas descritas anteriormente, se prefieren especialmente aquellas cuya emisión de olor corresponde al menos a la de las lipasas según la SEC ID NO:3-5 en el contexto de la presente invención, determinándose la intensidad de la emisión de olor en un procedimiento como el antes descrito.

Otro objeto de la invención es un ácido nucleico que codifica una lipasa de acuerdo con la invención, y un vector que contiene dicho ácido nucleico, en particular, un vector de clonación o un vector de expresión.

En este caso puede tratarse de moléculas de ADN o ARN. Pueden estar presentes como una única hebra, como una única hebra complementaria a esta única hebra o como una doble hebra. En el caso de las moléculas de ADN en particular, hay que tener en cuenta las secuencias de las dos cadenas complementarias en cada uno de los tres marcos de lectura posibles. Además, hay que tener en cuenta que diferentes codones, es decir, tripletas de bases, pueden codificar los mismos aminoácidos, de modo que una determinada secuencia de aminoácidos puede ser codificada por varios ácidos nucleicos diferentes. Debido a esta degeneración del código genético, todas las secuencias de ácido nucleico que pueden codificar una de las lipasas descritas anteriormente están incluidas en la presente invención. El especialista en la materia es capaz de determinar estas secuencias de ácidos nucleicos sin lugar a dudas, ya que, a pesar de la degeneración del código genético, se pueden asignar aminoácidos definidos a codones individuales. Por lo tanto, basándose en una secuencia de aminoácidos, el especialista puede determinar fácilmente los ácidos nucleicos que codifican esta secuencia de aminoácidos. Además, en los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, uno o más codones pueden ser sustituidos por codones sinónimos. Este aspecto se refiere en particular, a la expresión heteróloga de las enzimas de acuerdo con la invención. Así, cada organismo, por ejemplo, una célula huésped de una cepa de producción, tiene un uso particular de codones. El uso de codones se entiende como la traducción del código genético en aminoácidos por el organismo respectivo. Pueden producirse cuellos de botella en la biosíntesis de proteínas si los codones situados en el ácido nucleico del organismo se enfrentan a un número comparativamente pequeño de moléculas de ARNt cargadas. Aunque codifique el mismo aminoácido, esto hace que un codón se traduzca con menos eficacia en el organismo que un codón sinónimo que codifique el mismo aminoácido. Debido a la presencia de un mayor número de moléculas de ARNt para el codón sinónimo, éste puede ser traducido de forma más eficiente en el organismo.

Es posible para un especialista en la materia producir los correspondientes ácidos nucleicos hasta genes completos sobre la base de secuencias conocidas de ADN y/o aminoácidos mediante procedimientos generalmente conocidos hoy en día, como la síntesis química o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto con procedimientos biológicos moleculares y/o químicos proteicos estándar. Estos procedimientos se conocen, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd Edition Cold Spring Laboratory Press.

A los efectos de la presente invención, se entiende que los vectores son elementos formados por ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención como zona de ácido nucleico caracterizante. Son capaces de establecerlo como un elemento genético estable en una especie o una línea celular a lo largo de varias generaciones o divisiones celulares. Los vectores, especialmente cuando se utilizan en bacterias, son plásmidos especiales, es decir, elementos genéticos circulares. En el contexto de la presente invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención se clona en un vector. Los vectores incluyen, por ejemplo, aquellos cuyo origen son plásmidos bacterianos, virus o

bacteriófagos, o vectores predominantemente sintéticos o plásmidos con elementos de diversos orígenes. Con los demás elementos genéticos presentes en cada caso, los vectores son capaces de establecerse como unidades estables en las células del huésped en cuestión durante varias generaciones. Pueden existir de forma extra cromosómica como unidades separadas o integrarse en un cromosoma o ADN cromosómico.

5 Los vectores de expresión comprenden secuencias de ácido nucleico que les permiten replicarse en las células huésped que los contienen, preferentemente microorganismos, de modo particularmente preferente bacterias, y llevar un ácido nucleico contenido a expresarse allí. La expresión está influenciada en particular, por el promotor o los promotores que regulan la transcripción. En principio, la expresión puede ser efectuada por el promotor natural originalmente ubicado
10 aguas arriba del ácido nucleico a expresar, pero también por un promotor de la célula huésped provisto en el vector de expresión o también por un promotor modificado o completamente diferente de otro organismo u otra célula huésped. En el presente caso, se proporciona al menos un promotor para la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención y se utiliza para su expresión. Los vectores de expresión pueden ser además regulables, por ejemplo, cambiando las condiciones de cultivo o cuando se alcanza una determinada densidad celular de las células huésped que los contienen, o añadiendo determinadas sustancias, en particular, activadores de la expresión génica. Un ejemplo de esta sustancia es el derivado de la galactosa isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), que se utiliza como activador del operón bacteriano de la lactosa (operón lac). A diferencia de los vectores de expresión, el ácido nucleico contenido en los vectores de clonación no se expresa.

20 Otro objeto de la invención es una célula huésped no humana que comprende un ácido nucleico o vector de acuerdo con la invención, o que comprende una lipasa de acuerdo con la invención, en particular, una que secreta la lipasa en el medio que rodea la célula huésped. Preferentemente, un ácido nucleico o vector de acuerdo con la invención se transforma en un microorganismo, que entonces constituye una célula huésped de acuerdo con la invención. Alternativamente, los componentes individuales, es decir, las partes de ácido nucleico o los fragmentos de un ácido nucleico de acuerdo con la
25 invención, pueden introducirse en una célula huésped de manera que la célula huésped resultante contenga un ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención. Este procedimiento es particularmente adecuado si la célula huésped ya contiene uno o más componentes de un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención y los componentes adicionales se complementan en consecuencia. Los procedimientos para la transformación de células están establecidos en la técnica anterior y son suficientemente conocidos por el especialista. En principio, todas las células, es decir, procariotas o eucariotas, son adecuadas como células huésped. Las células huésped preferidas son aquellas que pueden ser manipuladas de forma genéticamente ventajosa, por ejemplo, en lo que respecta a la transformación con el ácido nucleico o el vector y su establecimiento estable, por ejemplo, hongos unicelulares o bacterias. Además, las células huésped preferidas se caracterizan por su buena manejabilidad microbiológica y biotecnológica. Esto se refiere, por ejemplo, a la facilidad de cultivo, a las altas tasas de crecimiento, a las bajas necesidades de medios de fermentación y a las buenas tasas de producción y secreción de proteínas extrañas. Las células huésped preferidas de acuerdo con la invención secretan la proteína expresada (transgénicamente) en el medio que rodea a las células huésped. Además, las lipasas pueden ser modificadas por las células que las producen después de su producción, por ejemplo, mediante la unión de moléculas de azúcar, la formilación, la aminación, etc. Estas modificaciones postraduccionales pueden afectar funcionalmente a la lipasa.

40 Otras realizaciones preferidas representan tales células huésped cuya actividad puede ser regulada debido a elementos reguladores genéticos, por ejemplo, proporcionados en el vector, pero que también pueden estar presentes en estas células desde el principio. Por ejemplo, mediante la adición controlada de productos químicos compuestos que sirven de activadores, cambiando las condiciones de cultivo o cuando se alcanza una determinada densidad celular, estos pueden ser estimulados a expresarse. Esto permite una producción económica de las proteínas de la invención. Un ejemplo de dicho compuesto es el IPTG, tal y como se ha descrito anteriormente.

50 Las células huésped preferidas son células procariotas o bacterianas. Las bacterias se caracterizan por sus breves tiempos de generación y sus escasas exigencias en cuanto a las condiciones de cultivo. Como resultado, pueden establecerse procedimientos de cultivo o de preparación poco costosos. Además, el especialista tiene una gran experiencia con las bacterias en la tecnología de la fermentación. Para una producción específica, las bacterias gram-negativas o gram-positivas pueden ser adecuadas por una amplia variedad de razones que deben determinarse experimentalmente en casos individuales, como las fuentes de nutrientes, la tasa de formación de productos, los requisitos de tiempo, etc.

55 En las bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli*, un gran número de proteínas son secretadas en el espacio periplásmico, es decir, el compartimento entre las dos membranas que encierran las células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Además, las bacterias Gram negativas también pueden diseñarse para secretar las proteínas expresadas no sólo en el espacio periplásmico, sino en el medio que rodea a la bacteria. En cambio, las bacterias Gram-positivas, como los bacilos o los actinomicetos u otros representantes de los *Actinomycetales*, no tienen una membrana externa, por lo que las proteínas secretadas se liberan inmediatamente en el medio que rodea a la bacteria, normalmente el medio de cultivo, del que se pueden purificar las proteínas expresadas. Pueden aislarse directamente del medio o procesarse posteriormente. Además, las bacterias Gram-positivas están emparentadas o son idénticas a la mayoría de los organismos de origen de las enzimas técnicamente importantes y suelen producir ellas mismas enzimas comparables, por lo que tienen un uso de codones similar y su aparato de síntesis de proteínas está naturalmente alineado
60 en consecuencia.

Las células huésped de acuerdo con la invención pueden ser modificadas con respecto a sus requisitos para las condiciones de cultivo, pueden tener marcadores de selección diferentes o adicionales o pueden expresar proteínas aún diferentes o adicionales. En particular, también pueden ser células huésped que expresan transgénicamente varias proteínas o enzimas.

La presente invención es en principio aplicable a todos los microorganismos, en particular, a todos los microorganismos fermentables, en particular, preferentemente a los del género *Bacillus*, y conduce a que las proteínas de acuerdo con la invención puedan producirse utilizando dichos microorganismos. Dichos microorganismos representan entonces células huésped en el sentido de la invención.

En otra realización de la invención, la célula huésped se caracteriza por ser una bacteria, preferiblemente una seleccionada del grupo de géneros de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, además preferiblemente una seleccionada del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Sin embargo, la célula huésped también puede ser una célula eucariota caracterizada por tener un núcleo. Así, otro objeto de la invención es una célula huésped caracterizada por tener un núcleo. A diferencia de las células procariotas, las células eucariotas son capaces de modificar postraduccionalmente la proteína formada. Ejemplos de ello son hongos como los actinomicetos o levaduras como *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Esto puede ser especialmente ventajoso, por ejemplo, si las proteínas van a sufrir modificaciones específicas en relación con su síntesis que hacen posible estos sistemas. Las modificaciones que sufren los sistemas eucariotas, especialmente en relación con la síntesis de proteínas, incluyen, por ejemplo, la unión de compuestos de bajo peso molecular, como anclajes de membrana u oligosacáridos. Estas modificaciones de oligosacáridos pueden ser deseables, por ejemplo, para reducir la alergenicidad de una proteína expresada. La coexpresión con enzimas producidas naturalmente por dichas células, como las celulasas, también puede ser beneficiosa. Además, los sistemas de expresión de hongos termófilos, por ejemplo, pueden ser especialmente adecuados para la expresión de proteínas o variantes resistentes a la temperatura.

Las células huésped de la invención se cultivan y fermentan de manera convencional, por ejemplo, en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso, se inocula un medio nutritivo adecuado con las células huésped y se recoge el producto del medio tras un periodo de tiempo que se determinará experimentalmente. Las fermentaciones continuas se caracterizan por el logro de un equilibrio en estado estacionario, en el que las células mueren parcialmente pero también vuelven a crecer durante un periodo de tiempo comparativamente largo, y al mismo tiempo la proteína formada puede ser eliminada del medio.

Las células huésped de acuerdo con la invención se utilizan preferentemente para producir lipasas de acuerdo con la invención. Otro objeto de la invención es, por tanto, un procedimiento para producir una lipasa que comprende
a) cultivar una célula huésped de acuerdo con la invención, y
b) aislar la lipasa del medio de cultivo o de la célula huésped.

Este objeto de la invención comprende preferentemente procesos de fermentación. Los procesos de fermentación son conocidos por sí mismos en el arte previo y representan el paso de producción a gran escala, generalmente seguido por un procedimiento de purificación adecuado del producto producido, por ejemplo, las lipasas de acuerdo con la invención. Todos los procedimientos de fermentación basados en un proceso correspondiente para la producción de una lipasa de acuerdo con la invención representan realizaciones de esta materia de la invención.

Los procedimientos de fermentación que se caracterizan porque la fermentación se lleva a cabo mediante una estrategia de alimentación son especialmente adecuados. Aquí se alimentan los componentes de los medios consumidos por el cultivo continuo. De esta manera, se pueden conseguir aumentos considerables tanto en la densidad celular como en la masa celular o masa seca y/o en particular, en la actividad de la lipasa de interés. Además, la fermentación también puede diseñarse de forma que los productos metabólicos indeseables se filtren o neutralicen mediante la adición de tampones o contraiones adecuados.

La lipasa producida puede cosecharse del medio de fermentación. Este procedimiento de fermentación es preferible al aislamiento de la lipasa de la célula huésped, es decir, a la preparación del producto a partir de la masa celular (masa seca), pero requiere la provisión de células huésped adecuadas o de uno o más marcadores o mecanismos de secreción adecuados y/o sistemas de transporte para que las células huésped secreten la lipasa en el medio de fermentación. En ausencia de secreción, el aislamiento de la lipasa de la célula huésped, es decir, la purificación de la misma a partir de la masa celular, puede realizarse alternativamente, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio o etanol, o por purificación cromatográfica.

Todas las circunstancias antes explicadas pueden combinarse en procedimientos para producir lipasas de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la invención es una composición caracterizada porque comprende una lipasa de acuerdo con la invención descrita anteriormente. Preferentemente, la composición es un detergente y producto de limpieza.

5 Este objeto de la invención incluye todos los detergentes y productos de limpieza factibles, tanto concentrados como composiciones no diluidas, para su uso a escala comercial, en la lavadora o en el lavado o limpieza a mano. Esto incluye, por ejemplo, los detergentes para textiles, alfombras o fibras naturales, para los que se utiliza el término detergente. También incluye, por ejemplo, los detergentes para lavavajillas o los detergentes para lavavajillas manuales o los
10 limpiadores para superficies duras como el metal, el vidrio, la porcelana, la cerámica, los azulejos, la piedra, las superficies pintadas, los plásticos, la madera o el cuero, para los que se utiliza la denominación de detergente limpiador, es decir, además de los detergentes para lavavajillas manuales y automáticos, por ejemplo, los detergentes abrasivos, los limpiadores de vidrio, los agentes de enjuague de fragancias para el inodoro, etc. Los detergentes y productos de limpieza en el contexto de la invención también incluyen las sustancias auxiliares de lavado que se añaden al propio detergente durante el lavado manual o a máquina de los textiles para conseguir un efecto adicional. Además, los detergentes y
15 productos de limpieza en el contexto de la invención también incluyen los agentes de pretratamiento y postratamiento textil, es decir, aquellos agentes con los que se pone en contacto la prenda de ropa antes del lavado propiamente dicho, por ejemplo, para disolver la suciedad persistente, y también aquellos agentes que, en un paso posterior al lavado textil propiamente dicho, confieren otras propiedades deseables a la prenda de ropa, como un tacto agradable, resistencia a las arrugas o baja carga estática. Entre estos últimos agentes se encuentran los suavizantes.

20 Los detergentes y productos de limpieza de acuerdo con la invención, que pueden presentarse como sólidos en polvo, en forma de partículas, por ejemplo, como soluciones homogéneas o suspensiones, pueden contener, además de una lipasa de acuerdo con la invención, todos los ingredientes conocidos habituales en tales agentes, preferiblemente con al menos un ingrediente más presente en el agente. Las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener, en particular,
25 tensioactivos, reforzadores, compuestos de peróxígeno o activadores de la decoloración. Además, pueden contener disolventes orgánicos miscibles en agua, otras enzimas, agentes secuestrantes, electrolitos, reguladores del pH y/o otros auxiliares como blanqueadores ópticos, inhibidores del encanecimiento, reguladores de la espuma, así como colorantes y fragancias y combinaciones de los mismos.

30 En particular, es ventajosa una combinación de una lipasa de acuerdo con la invención con uno o más ingredientes adicionales del agente, ya que dicho agente en realizaciones preferidas de acuerdo con la invención tiene un rendimiento de limpieza mejorado debido a los sinergismos resultantes. En particular, dicho sinergismo puede lograrse combinando una lipasa de acuerdo con la invención con un tensioactivo y/o un constructor (sustancia estructural) y/o un compuesto de peróxígeno y/o un activador de blanqueo.

35 Los ingredientes ventajosos de las composiciones de acuerdo con la invención se divulgan en la solicitud de patente internacional WO2009/121725, comenzando allí en la página 5, penúltimo párrafo, llegando hasta la página 13 después del segundo párrafo. Se hace referencia expresa a esta divulgación y su contenido se incorpora a la presente solicitud de patente.

40 En otras realizaciones de la invención, la composición se caracteriza porque comprende
a) 1-85 % en peso, preferentemente 5-65 % en peso, de tensioactivos; y/o
a) 0-45 % en peso, preferentemente 0,1-15 % en peso, de constructores (sustancias estructurales); y/o
45 a) 0,0005-15 % en peso, preferentemente 0,001-5 % en peso, de proteasa; y/o
a) 0,0005-15 % en peso, preferentemente 0,001-5 % en peso, de amilasa; y/o
a) 0,00005-15 % en peso, preferentemente 0,0001-5 % en peso, de mananasa; y/o
a) 0,00005-15 % en peso, preferentemente 0,0001-5 % en peso, de celulasa / pectato liasa; y/o
a) 0,00005-15 g/carga de lavado, preferentemente 0,0001-5 g/carga de lavado, de xantano liasa; y/o
50 a) 0,00005-15 g/carga de lavado, preferentemente 0,00005-15 g/carga de lavado, de endoglucanasa capaz de digerir la goma de xantano.

Un agente de acuerdo con la invención contiene ventajosamente la lipasa en una cantidad de 2 µg a 20 mg, preferentemente de 5 µg a 17,5 mg, más preferentemente de 20 µg a 15 mg y más preferentemente de 50 µg a 10 mg por g del agente. Además, la composición de acuerdo con la invención puede contener ventajosamente la lipasa en una
55 cantidad de 0,00005-15 % en peso en relación con la enzima activa, preferentemente de 0,0001-5 % en peso y más preferentemente de 0,001-1 % en peso. Además, la lipasa contenida en la composición, y/u otros ingredientes de la misma, pueden estar recubiertos de una sustancia impermeable a la enzima a temperatura ambiente o en ausencia de agua, que se hace permeable a la enzima en condiciones de uso de la composición. Dicha realización de la invención está caracterizada porque la lipasa está recubierta con una sustancia impermeable a la lipasa a temperatura ambiente o
60 en ausencia de agua. Además, los detergentes y productos de limpieza en sí mismos también pueden estar envasados en un recipiente, preferiblemente un recipiente permeable al aire, del que se desprende poco antes de su uso o durante el proceso de lavado.

En otras realizaciones de la invención, la composición se caracteriza porque
65 a) está presente en forma sólida, en particular, como polvo que fluye libremente con una densidad aparente de 300 g/l a 1200 g/l, en particular, de 500 g/l a 900 g/l, o

- b) está presente en forma pastosa o líquida, y/o
- c) está presente en forma de gel o de bolsita (bolsa), y/o
- d) está en forma de sistema de un solo componente, o
- e) se divide en varios componentes.

5

Estas realizaciones de la presente invención comprenden todas las formas de dosificación sólidas, en polvo, líquidas, en gel o pastosas de los agentes de acuerdo con la invención, que opcionalmente también pueden consistir en varias fases y pueden estar presentes en forma comprimida o no comprimida. El agente puede presentarse en forma de polvo fluido, en particular, con una densidad aparente de 300 g/l a 1200 g/l, en particular, de 500 g/l a 900 g/l o de 600 g/l a 850 g/l. Las formas de dosificación sólida del agente incluyen además extruidos, gránulos, tabletas o bolsas. Alternativamente, la composición puede estar en forma de líquido, gel o pasta, por ejemplo, en forma de detergente líquido no acuoso o en forma de detergente líquido acuoso o pasta. Además, la composición puede estar presente en forma de un sistema de un solo componente. Dichas composiciones constan de una fase. Alternativamente, un agente puede constar de varias fases. En consecuencia, dicho agente se divide en varios componentes.

10

15

Los detergentes y productos de limpieza de acuerdo con la invención pueden contener sólo una lipasa. Alternativamente, también pueden contener otras enzimas hidrolíticas u otras enzimas en una concentración apropiada para la eficacia de la composición. Por lo tanto, otra realización de la invención son los agentes que comprenden además una o más enzimas adicionales. Preferentemente, todas las enzimas que pueden desarrollar una actividad catalítica en el agente de acuerdo con la invención pueden utilizarse como enzimas adicionales, en particular, una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulosa, mañanas, tañase, milanese, xantanas, xantanas, β -glucosadas, pectinasa, cartaginesa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa u otras lipasas - distinguibles de las lipasas de acuerdo con la invención - así como sus mezclas. Ventajosamente, otras enzimas están contenidas en la composición en una cantidad de 1×10^{-8} a 5 % en peso, basado en la proteína activa, en cada caso. De forma cada vez más preferente, cada enzima adicional está presente en la composición de acuerdo con la invención en una cantidad de 1×10^{-7} -3 % en peso, de 0,00001-1 % en peso, de 0,00005-0,5 % en peso, de 0,0001 a 0,1 % en peso y de forma particularmente preferente de 0,0001 a 0,05 % en peso, en base a la proteína activa. De manera especialmente preferente, las enzimas presentan un rendimiento de limpieza sinérgico contra determinadas suciedades o manchas, es decir, las enzimas contenidas en la composición de agentes se apoyan mutuamente en su rendimiento de limpieza. Muy preferentemente, dicho sinergismo está presente entre la lipasa contenida de acuerdo con la invención y otra enzima de un agente de acuerdo con la invención, incluyendo en particular, entre dicha lipasa y una amilasa y/o una proteasa y/o una mananasa y/o una celulasa y/o una pectinasa. Pueden producirse efectos sinérgicos no sólo entre diferentes enzimas, sino también entre una o más enzimas y otros ingredientes de la composición de acuerdo con la invención.

20

25

30

35

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras, que se caracteriza porque en al menos una etapa del procedimiento se utiliza un agente de acuerdo con la invención, o porque en al menos una etapa del procedimiento se hace catalíticamente activa una lipasa de acuerdo con la invención, en particular, de manera que la lipasa se utiliza en una cantidad de 40 μ g a 4 g, preferiblemente de 50 μ g a 3 g, más preferiblemente de 100 μ g a 2 g y más preferiblemente de 200 μ g a 1 g.

40

En varias realizaciones, el procedimiento antes descrito se caracteriza porque la lipasa se utiliza a una temperatura de 0-100°C, preferiblemente de 0-60°C, más preferiblemente de 20-45°C y más preferiblemente de 40°C.

45

Esto incluye tanto los procedimientos manuales como los de máquina, siendo preferibles los mecánicos. Los procedimientos para la limpieza de textiles se caracterizan generalmente por el hecho de que se aplican diversas sustancias activas de limpieza al artículo que se va a limpiar en varios pasos del proceso y se lavan después del tiempo de exposición, o que el artículo que se va a limpiar se trata de otra manera con un detergente o una solución o dilución de este agente. Lo mismo ocurre con los procesos de limpieza de todos los materiales que no sean textiles, en particular, las superficies duras. Todos los procedimientos de lavado o limpieza concebibles pueden ser enriquecidos en al menos uno de los pasos del proceso mediante la aplicación de un detergente y productos de limpiezas de acuerdo con la invención o una lipasa de acuerdo con la invención y entonces constituyen realizaciones de la presente invención. Todos los hechos, objetos y realizaciones descritos para las lipasas de acuerdo con la invención y los agentes que la contienen son también aplicables a esta materia de la invención. Por lo tanto, aquí se hace referencia explícita a la divulgación en el lugar apropiado con la indicación de que esta divulgación también se aplica a los procedimientos anteriores de acuerdo con la invención.

50

55

Dado que la lipasa de acuerdo con la invención ya tiene naturalmente una actividad hidrolítica y también desarrolla esta actividad en medios que de otro modo no tienen poder de limpieza, como en un mero tampón, un único paso y/o el único paso de tal proceso puede consistir en que, si se desea, una lipasa de acuerdo con la invención se ponga en contacto con la suciedad como único componente activo de limpieza, preferiblemente en una solución tampón o en agua. Esto constituye otra realización de la presente invención.

60

Las realizaciones alternativas de esta materia de la invención también representan procedimientos para el tratamiento de materias primas textiles o para el cuidado textil, en los que una lipasa de acuerdo con la invención está activa en al menos un paso del proceso. Los procedimientos preferidos son los de materias primas textiles, fibras o textiles con componentes naturales.

65

5 Todos los hechos, objetos y realizaciones descritos para la lipasa de acuerdo con la invención y los agentes que la contienen son también aplicables a esta materia de la invención. Por lo tanto, se hace referencia explícita aquí a la divulgación en el lugar apropiado con la indicación de que esta divulgación también se aplica al uso anterior de acuerdo con la invención.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una lipasa de acuerdo con la invención o una lipasa que puede obtenerse por medio de un procedimiento de acuerdo con la invención en un detergente y productos de limpieza para la eliminación de suciedades que contienen lípidos.

15 Las lipasas aquí descritas se caracterizan especialmente por la reducción de la formación de olores cuando se utilizan en detergentes para textiles. Por lo tanto, también forma parte de la invención un uso correspondiente para reducir la formación de olores indeseables en textiles lavados con detergentes que contienen lipasa. En particular, la invención también se refiere al uso de una lipasa como la descrita en el presente documento en una composición de lavado o limpieza para reducir los malos olores de los textiles lavados con ella.

20 Todos los hechos, objetos y realizaciones descritos para la lipasa de acuerdo con la invención y las composiciones que la contienen son también aplicables a estos objetos de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Condiciones de lavado y ensayo de olor

Sinopsis de las mutaciones:

25

Variante	Secuencia			SEC ID NO:
Variante 1 (ejemplo comparativo)				1
Variante 2 (de acuerdo con la invención)	P208N	T231R	N233R	3
Variante 2 (de acuerdo con la invención)	F211N	T231R	N233R	4
Variante 3 (de acuerdo con la invención)	P253N	T231R	N233R	5

Formulaciones de detergentes líquidos (ver Tabla 1):

30 Una formulación contenía la lipasa de referencia con la secuencia de aminoácidos según SEC ID NO:1, otras formulaciones contenían las lipasas de acuerdo con la invención con la secuencia según SEC ID NO:3-5.

35 Para la prueba de olor, se preparó una placa de microtitulación con tiras textiles limpias (algodón, 10 mm). La solución de detergente y la placa de microtitulación se precalentaron a 40°C. Las tiras textiles se lavaron durante 1 h a 40°C con una solución detergente que contenía lipasa. El detergente se diluyó hasta una concentración de 4,7 g/L en la solución de lavado. La concentración de lipasa fue del 0,4 %. Se utilizó como referencia la matriz de lavado sin lipasa.

Tras el lavado, se secaron las tiras textiles y se ensuciaron con suciedad grasa. Las grasas se adicionaron en las siguientes proporciones:

40 Rama (margarina): mantequilla: crema para la piel: aceite de oliva: aceite mineral en la proporción 1: 1: 1: 2: 2.

45 Después, las tiras textiles preparadas con manchas de grasa se almacenaron por separado en contenedores de muestras herméticos durante 7 días a temperatura ambiente. Para la prueba de olor, se utilizó un panel de 6 probadores (panel sensorial) para oler las tiras textiles después de 7 días y evaluar su intensidad de olor. Si la lipasa está presente en los textiles, las suciedades grasas se descomponen y producen un mal olor. La prueba de olor consiste en puntuar en una escala de 1 a 5, siendo las puntuaciones más bajas beneficiosas en términos de olor. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 1: Formulaciones de agentes de lavado usadas

Sustancia de contenido	V1	E1
LAS-Na	10,6	10,6
FA 7 EO	3	3
Jabón Na C16-18	1,2	1,2
HEDP-Na ₄	0,81	0,81
Poliacrilato	2,2	2,2
Silicato de sodio 2.1	5,7	5,7
Carbonato de sodio	22	22
Percarbonato de sodio	10	10
TAED	3	3

(continuación)

Sustancia de contenido	V1	E1
Acilhidrazona	-	0,09
Carboximetilcelulosa	2,5	2,5
Agentes antiespumantes	0,046	0,046
Proteasa / amilasa / celulasa	0,61	0,61
Lipasa	0,005	0,005
Aclarante óptico	0,183	0,183
Perfume	0,3	0,3
Sulfato de sodio	sobre 100	sobre 100

Tabla 2: Resultados de la prueba de olores

Muestra	Algodón
Referencia (matriz del detergente sin lipasa)	0,5
Matriz del detergente + lipasa de referencia (SEC ID NO:2)	1,8
Matriz del detergente + lipasa de acuerdo con la invención (SEC ID NO:3)	1,1
Matriz del detergente + lipasa de acuerdo con la invención (SEC ID NO:4)	0,9
Matriz del detergente + lipasa de acuerdo con la invención (SEC ID NO:5)	1,3

5

Los resultados muestran que las variantes de lipasa de acuerdo con la invención se caracterizan por una menor generación de malos olores en comparación con la enzima de tipo salvaje.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> Henkel AG & Co. KGaA
 <120> Lipasas para el uso en detergentes y productos de limpieza
 <130> PT033756PCT
 <150> 102016204813.9 <151> 2016-03-23 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1 <211> 269 <212> PRT
 <213> Thermomyces lanuginosus <400> 1

15

ES 2 898 699 T3

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45

Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60

Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80

Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
 85 90 95

Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
 100 105 110

Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
 115 120 125

Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140

His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160

Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val

ES 2 898 699 T3

165

170

175

Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190

Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
 195 200 205

Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
 210 215 220

Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240

Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
 245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265

<210> 2

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Variante optimizada de SEC ID NO:1 <400> 2

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45

Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60

Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80

Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
 85 90 95

Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
 100 105 110

5

Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
 115 120 125

Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140

His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160

Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175

Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190

Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
 195 200 205

Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
 210 215 220

Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Arg Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240

Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
 245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265

<210> 3

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Variante optimizada de SEC ID NO:1

<400> 3

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45

ES 2 898 699 T3

Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
50 55 60

Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
65 70 75 80

Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
85 90 95

Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
100 105 110

Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
115 120 125

Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
130 135 140

His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
145 150 155 160

Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
165 170 175

Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
180 185 190

Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Asn
195 200 205

Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
210 215 220

Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Arg Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
225 230 235 240

Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
260 265

<210> 4

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5

ES 2 898 699 T3

<223> Variante optimizada de SEC ID NO:1

<400> 4

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45
 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60
 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
 85 90 95
 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
 100 105 110
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
 115 120 125
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190
 Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
 195 200 205
 Arg Glu Asn Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Arg Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240

ES 2 898 699 T3

Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
 245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265

<210> 5

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Variante optimizada de SEC ID NO:1

<400> 5

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45

Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60

Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80

Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
 85 90 95

Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
 100 105 110

Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
 115 120 125

Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140

His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160

Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175

ES 2 898 699 T3

Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
180 185 190

Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
195 200 205

Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
210 215 220

Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Arg Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
225 230 235 240

Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Asn Asp Ile Pro
245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
260 265

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una lipasa que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO: 1 en la longitud total de la misma y que tiene al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, en cada caso referido a la numeración según la SEC NO: 1, siendo que la sustitución de al menos un aminoácido se seleccionó del grupo formado por 208N y 253N, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1.
- 10 2. Lipasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la lipasa comprende la(s) sustitución(es) de aminoácidos P208N, y/o P253N, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1.
3. Lipasa, caracterizada porque
- 15 a) se puede obtener a partir de una lipasa de acuerdo con la reivindicación 1 y 2 como molécula de partida por sustitución de aminoácidos conservadora única o múltiple, en la que la lipasa comprende al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, preferentemente 208, 211 o 253, en cada caso referido a la numeración según SEC ID NO: 1, en la que la al menos una sustitución de aminoácidos se seleccionó del grupo que consiste en 208N y 253N, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1; y/o
- 20 b) se puede obtener a partir de una lipasa de acuerdo con la reivindicación 1 y 2 como molécula de partida por fragmentación, delección, inserción o mutagénesis de sustitución y comprende una secuencia de aminoácidos que coincide con la molécula de partida en una longitud de al menos 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 o 269 aminoácidos contiguos, en la que la lipasa comprende al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, preferentemente 208, 211 o 253, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO: 1, en la que la sustitución de al menos un aminoácido se seleccionó del grupo formado por 208N y 253N, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1.
- 25
- 30 4. Lipasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la lipasa comprende además las sustituciones de aminoácidos T231R y N233R, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1.
5. Un procedimiento de producción de una lipasa que comprende la sustitución de al menos un aminoácido en al menos una de las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264, o 267, preferentemente 208, 211 o 253, en cada caso referido a la numeración según SEC ID NO: 1, en una lipasa de partida que tenga al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID NO:1 sobre la longitud total de la misma, de manera que la lipasa tenga una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones seleccionadas entre P208N y P253N.
- 35
- 40 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además uno o ambos de los siguientes pasos del procedimiento:
- a) la sustitución de al menos un aminoácido por una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, en la que la lipasa tiene al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones que comprenden las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264, o 267, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1, en la que la sustitución de al menos un aminoácido se seleccionó del grupo que consiste en 208N y 253N, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1;
- 45 b) la alteración de la secuencia de aminoácidos por fragmentación, delección, inserción o sustitución mutagénica de manera que la lipasa comprenda una secuencia de aminoácidos que coincida con la molécula madre en una longitud de al menos 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 o 269 aminoácidos contiguos, en la que la lipasa comprende al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones correspondientes a las posiciones 83, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 113, 174, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 227, 252, 253, 256, 258, 259, 260, 264 o 267, en cada caso referido a la numeración según la SEC NO: 1, en el que la sustitución de al menos un aminoácido se seleccionó del grupo formado por 208N y 253N, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1.
- 50

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la lipasa comprende además las sustituciones de aminoácidos T231R y N233R, en cada caso referido a la numeración según la SEC ID NO:1.
- 5 8. Ácido nucleico que codifica una lipasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 o que codifica una lipasa obtenida por un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7.
9. Un vector que contenga un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, en particular, un vector de clonación o un vector de expresión.
- 10 10. Una célula huésped no humana que comprenda un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o un vector de acuerdo con la reivindicación 9, o que comprenda una lipasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, o que comprenda una lipasa obtenida por un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 7, en particular, una que secreta la lipasa en el medio que rodea a la célula huésped.
- 15 11. Un procedimiento de producción de una lipasa que comprende
- a) cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10
- b) aislar la lipasa del medio de cultivo o de la célula huésped.
- 20 12. Agente, en particular, un detergente y productos de limpieza, caracterizado porque comprende al menos una lipasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una lipasa obtenida por un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7,
- a) en particular, dicha lipasa está presente en una cantidad de hasta el 1 % en peso en relación con la proteína activa; y/o
- b) mientras el agente, en particular, es un agente líquido.
- 25 13. Procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras, caracterizado porque en al menos una etapa del procedimiento se utiliza un agente de acuerdo con la reivindicación 12, o porque en al menos una etapa del procedimiento una lipasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 o una lipasa obtenida por un procedimiento de las reivindicaciones 5 a 7 se vuelve catalíticamente activa.
- 30 14. Uso de una lipasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de una lipasa que puede obtenerse por un procedimiento de las reivindicaciones 5 a 7 en un detergente y productos de limpieza para eliminar las suciedades que contienen lípidos o para reducir los malos olores de los textiles lavados con ellos.