

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 080**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2013 PCT/US2013/064672**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14059360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2013 E 13780299 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2021 EP 2906691**

54 Título: **Composiciones y métodos que comprenden una variante de enzima lipolítica**

30 Prioridad:

12.10.2012 US 201261713436 P

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

14.10.2021

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US**

72 Inventor/es:

**GRAYCAR, THOMAS P.;
PRICELIUS, SINA;
POULOSE, AYROOKARAN J. y
ESTELL, DAVID A.**

74 Agente/Representante:

FLORES DREOSTI, Lucas

ES 2 865 080 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 y métodos que comprenden una variante de enzima lipolítica

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 [0001] Las enzimas lipolíticas, incluidas las lipasas y las cutinasas, se han empleado en composiciones de limpieza detergentes para eliminar las manchas de grasa. Uno de los mecanismos por medio de los que funcionan las enzimas lipolíticas es la hidrólisis de los triglicéridos para generar ácidos grasos. Sin embargo, estas enzimas suelen ser inhibidas por los tensioactivos y otros componentes presentes en la composición de limpieza, lo que interfiere en su capacidad para eliminar las manchas de grasa. Por consiguiente, existe la necesidad de contar con enzimas lipolíticas que puedan funcionar en el duro entorno de las composiciones de limpieza.

10 SUMARIO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención proporciona enzimas lipolíticas mejoradas, especialmente enzimas útiles para composiciones detergentes. Específicamente, la presente invención proporciona variantes de enzima lipolítica que presentan una o más modificaciones, como una sustitución, en comparación con una enzima lipolítica original. Esto puede lograrse mediante la introducción de mejoras en la enzima, por medio de la mejora del rendimiento de lavado en formulaciones detergentes estándar y formulaciones detergentes de bajo contenido en tensioactivos, la estabilidad de la enzima en composiciones detergentes, la termoestabilidad de la enzima, la hidrólisis de sustrato, la expresión y/o los perfiles de carga/hidrofobicidad modificados que mejoran la eficacia de la enzima en un ciclo de lavado. La presente invención proporciona variantes de enzimas lipolíticas como se define en la reivindicación 1, incluidas, entre otras, las variantes de enzimas lipasas lipolíticas, que son particularmente adecuadas y útiles en una variedad de aplicaciones de limpieza. La invención también proporciona métodos de limpieza que utilizan variantes de enzima lipolítica de la presente invención.

[0003] Como se expone en el presente documento, una variante de enzima lipolítica o un fragmento activo de la misma puede comprender una modificación de aminoácido en una enzima lipolítica original, donde la modificación se encuentra en una posición productiva de la variante de enzima lipolítica, donde al menos una modificación de las modificaciones probadas en la posición productiva cumple al menos con uno de los siguientes criterios:

- a) una posición en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de p-nitrofenilo a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,9 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,0;
- 30 b) una posición en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de p-nitrofenilo a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,2;
- 35 c) una posición en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de p-nitrofenilo a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,5 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,5;

40 y donde la posición productiva es 130, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0004] En una realización, la invención es una composición de limpieza que comprende al menos una variante de enzima lipolítica de la invención. En algunas realizaciones, la invención incluye además una enzima adicional del grupo que consiste en hemicelulasas, celulasas, peroxidases, enzimas lipolíticas, enzimas metalolipolíticas, 45 xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, perhidrolasas, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tanasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasas y amilasas.

[0005] También se da a conocer un método de limpieza, que comprende poner en contacto una superficie o un artículo con una composición de limpieza que comprende al menos una variante de enzima lipolítica indicada 50 anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un mapa del plásmido de pHYT-TLLwt.

La figura 2 muestra la actividad de lipasa en la enzima lipasa de TLL con diferentes niveles de adyuvante.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

55 [0007] La presente invención proporciona enzimas lipolíticas mejoradas tal y como se define en la reivindicación 1, especialmente enzimas útiles para composiciones detergentes. Específicamente, la presente invención proporciona variantes de enzima lipolítica que presentan una o más modificaciones, como una sustitución, en

comparación con una enzima lipolítica original. Esto puede lograrse mediante la introducción de mejoras en la enzima, por medio de la mejora del rendimiento de lavado, la estabilidad de la enzima en composiciones detergentes, la termoestabilidad de la enzima, y/o la hidrólisis de sustrato modificada, y/o los perfiles de carga/hidrofobicidad que mejoran la eficacia de la enzima en un ciclo de lavado. La presente invención proporciona
 5 variantes de enzimas lipolíticas, incluidas, entre otras, las variantes de enzimas lipasas lipolíticas, que son particularmente adecuadas y útiles en una variedad de aplicaciones de limpieza. También se dan a conocer composiciones que comprenden al menos una de las variantes de enzimas lipolíticas (p. ej., variantes de lipasas) establecidas en la presente memoria. Algunas de dichas composiciones comprenden composiciones detergentes. Se proporcionan variantes de enzimas lipolíticas de la especie *Thermomyces* y composiciones que comprenden
 10 una o más de dichas variantes de lipasas. Las variantes de enzima lipolítica de la presente invención pueden combinarse con otras enzimas útiles en composiciones detergentes. También se proporcionan composiciones enzimáticas que presentan un rendimiento de lavado comparable o mejorado, en comparación con enzimas lipolíticas conocidas, tales como las enzimas lipasas lipolíticas conocidas. También se proporcionan métodos de limpieza que utilizan variantes de enzima lipolítica de la presente exposición.

15 **[0008]** La exposición incluye variantes de enzima de enzimas lipolíticas que presentan una o más modificaciones a partir de una enzima lipolítica original. Las variantes de enzima pueden ser útiles en una composición detergente con un índice de rendimiento mínimo en relación con el rendimiento de lavado, la hidrólisis de sustrato, la estabilidad de la enzima en composiciones detergentes y la termoestabilidad de la enzima, al tiempo que presentan al menos una de estas características mejorada a partir de una enzima lipolítica original.

20 **[0009]** Además, la exposición proporciona modificaciones, tales como una sustitución, en una o más posiciones de aminoácido en una enzima lipolítica que puede ser útil en una composición detergente donde las modificaciones favorables dan como resultado un índice de rendimiento mínimo en relación con el rendimiento de lavado, la hidrólisis de sustrato, la estabilidad de la enzima en las composiciones detergentes y la termoestabilidad de la enzima, al tiempo que presentan al menos una de estas características mejorada a partir de una enzima lipolítica
 25 original. Estas modificaciones se consideran modificaciones adecuadas. Estas posiciones de aminoácido pueden considerarse posiciones útiles para modificaciones combinatorias de una enzima lipolítica original. Las posiciones de aminoácido de enzimas lipolíticas que se consideran posiciones útiles se pueden caracterizar, además, por tener múltiples modificaciones que son adecuadas para su uso en una composición detergente. Para cada posición, un mayor número de posibles modificaciones adecuadas indica una mayor productividad de una posición concreta.

30 **[0010]** Salvo que se defina de otro modo en el presente texto, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entienden comúnmente los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica de la presente invención se pueden utilizar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, aquí se describen algunos
 35 métodos y materiales. Por consiguiente, los términos que se definen inmediatamente a continuación se describen de forma más completa con referencia a la memoria en su conjunto. Asimismo, en el sentido en que se usan en la presente memoria, los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia al plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Salvo que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en
 40 una orientación de amino a carboxi, respectivamente. Cabe comprender que la presente invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos específicos aquí descritos, dado que estos pueden variar en función del contexto en el que los utilizan los expertos en la materia.

45 **[0011]** Se pretende que cada limitación numérica máxima proporcionada a lo largo de la presente memoria incluya cada limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores se encontrasen expresamente escritas en el presente documento. Todo límite numérico mínimo proporcionado a lo largo de esta memoria incluirá todo límite numérico superior, como si dichos límites numéricos superiores estuvieran escritos expresamente en la presente memoria. Todo intervalo numérico proporcionado a lo largo de esta memoria incluirá todo intervalo numérico más reducido que se encuentre dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si dichos intervalos numéricos más reducidos estuvieran escritos expresamente en el presente documento.

50 **[0012]** Una "proteína" o "polipéptido" comprende una secuencia polimérica de residuos de aminoácido. Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en el presente documento. A lo largo de la presente exposición, se utiliza el código de una y tres letras para los aminoácidos, tal y como se define de conformidad con la comisión conjunta de nomenclatura bioquímica (JBCN, por sus siglas en inglés) de la IUPAC-IUB. Se comprenderá también que se puede codificar un polipéptido mediante más de una secuencia de nucleótidos debido
 55 a la degeneración del código genético. Las mutaciones se pueden denominar mediante el código de una letra para el aminoácido original, seguido por un número de posición y, a continuación, el código de una letra para la variante de aminoácido. Por ejemplo, la mutación de glicina (G) en la posición 87 a serina (S) se puede representar como "G087S" o "G87S". Pueden indicarse múltiples mutaciones insertando un "-" entre las mutaciones. Por ejemplo, las mutaciones en las posiciones 87 y 90 se pueden representar como "G087S-A090Y" o "G87S-A90Y" o "G87S +
 60 A90Y" o "G087S + A090Y".

[0013] Los términos “derivado/a(s) de” y “obtenido/a(s) de” se refieren no solo a una enzima lipolítica producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una enzima lipolítica codificada por una secuencia de ADN aislada de dicha cepa y producida en un organismo huésped que contiene dicha secuencia de ADN. De forma adicional, el término se refiere a una enzima lipolítica codificada por una secuencia de ADN de origen ADNC y/o sintético y que tiene las características identificativas de la enzima lipolítica en cuestión. A modo de ejemplo, “enzimas lipolíticas derivadas de *Thermomyces*” se refiere a las enzimas con actividad lipolítica que son producidas de forma natural por *Thermomyces*, así como a las enzimas lipolíticas como las producidas por fuentes de *Thermomyces*, pero que son producidas mediante el uso de técnicas de ingeniería genética por organismos no *Thermomyces* transformados con un ácido nucleico que codifica las enzimas lipolíticas.

[0014] Tal como se utiliza en el presente documento, “homología” se refiere a similitud o identidad de secuencia, prefiriéndose la identidad. La homología puede determinarse utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica (véase, p. ej., Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981); Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970); Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988); programas de *software* como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del paquete de *software* Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin); y Devereux *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 12:387-395 (1984)). Un ejemplo de algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento múltiple de secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos progresivos por pares. También puede trazar un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (véase, Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987)). El método es similar al descrito por Higgins y Sharp (véase, Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989)). Unos parámetros útiles de PILEUP incluyen un peso de hueco por defecto de 3,00, un peso de longitud de hueco por defecto de 0,10 y huecos de extremo ponderados. Otro ejemplo de algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul *et al.*, (véase, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); y Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Un programa BLAST especialmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase, Altschul *et al.*, *Meth. Enzymol.* 266:460-480 (1996)). WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores por defecto. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: intervalo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa en función de la composición de la secuencia concreta y de la composición de la base de datos concreta en la que se está buscando la secuencia de interés. No obstante, los valores pueden ajustarse para incrementar la sensibilidad.

[0015] El porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de referencia y una secuencia de interés de prueba puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. El porcentaje de identidad compartido por secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas se determina por comparación directa de la información de la secuencia entre las moléculas mediante el alineamiento de las secuencias y la determinación de la identidad por métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de un algoritmo adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, (véase, Altschul, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El *software* para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información de Biotecnología). Este algoritmo implica, en primer lugar, identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden con o cumplen con alguna puntuación umbral T con valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Estas coincidencias de palabras iniciales próximas actúan como puntos de partida para encontrar pares de secuencias de alta puntuación más largas que las contengan. Las coincidencias de palabras se expanden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias que se comparan hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X a partir de un valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa es cero o inferior; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 89:10915 (1992)) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M⁵, N⁻⁴, y una comparación de ambas cadenas.

[0016] El algoritmo BLAST realiza a continuación un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *supra*). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a un ácido nucleico de enzima lipolítica de la presente invención si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con respecto a un ácido nucleico de enzima lipolítica es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01 y siendo lo más preferible inferior a aproximadamente 0,001. Cuando el ácido nucleico de prueba codifica un polipéptido de enzima lipolítica, se considera que es similar a un ácido nucleico de enzima lipolítica concreto si la comparación tiene como resultado una probabilidad de suma más pequeña inferior a aproximadamente 0,5 y, más preferiblemente, inferior a aproximadamente 0,2.

[0017] Porcentaje “idéntico” o “de identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipéptido, se refiere a dos o más secuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de residuos de ácido nucleico o residuos de aminoácido, respectivamente, que son iguales cuando se comparan y se alinean para una similitud máxima, según se determine utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. “Porcentaje de identidad de secuencia” o “% de identidad” o “% de identidad de secuencia” o “% de identidad de secuencia de aminoácidos” de una secuencia de aminoácidos sujeto con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia (es decir, de consulta) significa que la secuencia de aminoácidos sujeto es idéntica (es decir, aminoácido a aminoácido) en un porcentaje específico con respecto a la secuencia de aminoácidos de consulta a lo largo de una longitud de comparación cuando las secuencias están alineadas de forma óptima. En consecuencia, un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos o un 80 % de identidad en lo que respecta a dos secuencias de aminoácidos significa que el 80 % de los residuos de aminoácido en dos secuencias de aminoácidos alineadas de forma óptima son idénticos.

[0018] “Porcentaje de identidad de secuencia” o “% de identidad” o “% de identidad de secuencia” o “% de identidad de secuencia de nucleótidos” de una secuencia de ácido nucleico sujeto con respecto a una secuencia de ácido nucleico de referencia (es decir, de consulta) significa que la secuencia de ácido nucleico sujeto es idéntica (es decir, nucleótido a nucleótido para una secuencia polinucleotídica) en un porcentaje específico con respecto a la secuencia de consulta a lo largo de una longitud de comparación cuando las secuencias están alineadas de forma óptima. En consecuencia, un 80 % de identidad de secuencia nucleotídica o un 80 % de identidad en lo que respecta a dos secuencias de ácido nucleico significa que el 80 % de los residuos de nucleótidos en dos secuencias de ácidos nucleicos alineadas de forma óptima son idénticos.

[0019] Los términos “alineamiento óptimo” o “alineado/a(s) de forma óptima” se refieren al alineamiento de dos (o más) secuencias que tienen la puntuación más alta de porcentaje de identidad. Por ejemplo, el alineamiento óptimo de dos secuencias de proteínas puede obtenerse alineando de forma manual las secuencias de forma que se alinee el máximo número de residuos de aminoácidos idénticos en cada secuencia o utilizando programas de *software* o procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de dos secuencias de ácido nucleico puede obtenerse alineando de forma manual las secuencias de forma que se alinee el máximo número de residuos de nucleótidos idénticos en cada secuencia o utilizando programas de *software* o procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

[0020] En algunos modos de realización, dos secuencias polipeptídicas se consideran “alineadas de forma óptima” cuando se alinean utilizando parámetros definidos, como una matriz de sustitución de aminoácidos definida, una penalización por existencia de hueco (también denominada penalización por hueco abierto) y una penalización por extensión de hueco, con el fin de conseguir la máxima puntuación de similitud posible para dicho par de secuencias. La matriz de puntuación de BLOSUM62 (véase, Henikoff & Henikoff, *supra*) suele utilizarse como matriz de sustitución de puntuación por defecto en algoritmos de alineamiento de secuencias de polipéptidos (p. ej., BLASTP). La penalización por existencia de hueco se impone para la introducción de un solo hueco de aminoácido en una de las secuencias alineadas, y la penalización por extensión de hueco se impone para cada posición de residuo en el hueco. Algunos ejemplos de parámetros de alineamiento utilizados son: Matriz de puntuación de BLOSUM62, penalización por existencia de hueco =11 y penalización por extensión de hueco =1. La puntuación del alineamiento es definida por las posiciones de aminoácido de cada secuencia en las que empieza y acaba el alineamiento (p. ej., la ventana de alineamiento), y opcionalmente por la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias, con el fin de conseguir la máxima puntuación de similitud posible.

[0021] El alineamiento óptimo entre dos o más secuencias puede determinarse manualmente mediante inspección visual o utilizando un ordenador como, por ejemplo, sin carácter limitativo, el programa BLASTP para secuencias de aminoácidos y el programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos (véase p. ej., Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 (1997); véase también la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI)).

[0022] Puede decirse que un polipéptido de interés es “sustancialmente idéntico” a un polipéptido original si el polipéptido de interés comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o al menos aproximadamente un 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido original. El porcentaje de identidad entre dos de dichos polipéptidos puede determinarse manualmente mediante la inspección de las dos secuencias polipeptídicas alineadas de forma óptima o utilizando programas de *software* o algoritmos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) con parámetros estándar. Un indicativo de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido reacciona inmunitariamente de forma cruzada con el segundo polipéptido. Normalmente, los polipéptidos que difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas reaccionan inmunitariamente de forma cruzada. Por tanto, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente en una sustitución conservativa de aminoácidos o una o más sustituciones conservativas de aminoácidos.

[0023] Puede decirse que un ácido nucleico de interés es “sustancialmente idéntico” a un ácido nucleico original si el ácido nucleico de interés comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o al menos aproximadamente un 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia nucleotídica del ácido nucleico original. El porcentaje de identidad entre dos de dichos ácidos nucleicos puede determinarse manualmente mediante la inspección de las dos secuencias de ácido nucleico alineadas de forma óptima o utilizando programas de *software* o algoritmos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) con parámetros estándar. Un indicativo de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas de ácido nucleico hibridan entre sí en condiciones estrictas (por ejemplo, en un intervalo de rigor medio-alto).

[0024] Un ácido nucleico o polinucleótido está “aislado” cuando está parcial o completamente separado de otros componentes, incluidos, entre otros, por ejemplo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. De manera similar, un polipéptido, proteína o péptido está “aislado” cuando está parcial o completamente separado de otros componentes, incluidos, entre otros, por ejemplo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. Desde el punto de vista de la molaridad, una especie aislada es más abundante que otras especies en una composición. Por ejemplo, una especie aislada puede comprender al menos aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % (desde el punto de vista de la molaridad) de todas las especies macromoleculares presentes. De forma preferible, la especie de interés está purificada hasta lograr una homogeneidad esencial (es decir, las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales). La pureza y la homogeneidad pueden determinarse utilizando un número de técnicas ampliamente conocidas en la técnica, como electroforesis en gel de agarosa o de poli(acrilamida) de una muestra de proteína o ácido nucleico, seguido de visualización tras la tinción. Si se desea, puede utilizarse una técnica de alta resolución, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), o medios similares, para la purificación del material.

[0025] El término “purificado(s)”, en aplicación a ácidos nucleicos o polipéptidos, indica un ácido nucleico o polipéptido que, en esencia, está libre de otros componentes según lo determinado por técnicas analíticas ampliamente conocidas en la técnica (p. ej., un polipéptido o un polinucleótido purificado forma una discreta banda en un gel de electroforesis, un eluato cromatográfico y/o un medio sometido a centrifugación en gradiente de densidad). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que da lugar esencialmente a una banda en un gel de electroforesis está “purificado”. Un ácido nucleico o polipéptido purificado es al menos aproximadamente un 50 % puro, normalmente al menos aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, aproximadamente un 99,5 %, aproximadamente un 99,6 %, aproximadamente un 99,7 %, aproximadamente un 99,8 % o más puro (p. ej., porcentaje en peso desde el punto de vista de la molaridad). De forma relacionada, la invención proporciona métodos de enriquecimiento de composiciones para una o más moléculas, como uno o más polipéptidos o polinucleótidos. Una composición se enriquece para una molécula cuando hay un incremento sustancial en la concentración de la molécula después de aplicar una técnica de purificación o enriquecimiento. Un polipéptido o un polinucleótido sustancialmente puro de la invención (p. ej., una variante de enzima lipolítica sustancialmente pura o un polinucleótido sustancialmente puro que codifica una variante de enzima lipolítica de la invención, respectivamente) comprenderán, normalmente, al menos aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, aproximadamente un 99,5 % o más en peso (desde el punto de vista de la molaridad) de todas las especies macromoleculares en una composición concreta.

[0026] La posición de un residuo de aminoácido en una secuencia de aminoácidos determinada se numera normalmente en el presente documento utilizando la numeración de la posición del residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL mostrada en SEQ ID NO:4. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *T. lanuginosus* TLL de SEQ ID NO:4 sirve como secuencia original de referencia. Una secuencia de aminoácidos determinada, como una secuencia de aminoácidos de una variante de enzima lipolítica descrita en el presente documento, puede alinearse con la secuencia de TLL (SEQ ID NO:4) utilizando un algoritmo de alineamiento tal como se describe en el presente documento, y un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos determinada que se alinea (preferiblemente, se alinea de forma óptima) con un residuo de aminoácido de la secuencia de TLL puede

numerarse de forma conveniente por referencia al residuo de aminoácido correspondiente en la secuencia de lipasa TLL.

Enzimas lipolíticas

5 **[0027]** Tal y como se utiliza en el presente documento, una enzima lipolítica incluye una enzima, un polipéptido o una proteína que muestran una capacidad de degradación de lípido, tal como una capacidad de degradación de un triglicérido o un fosfolípido. La enzima lipolítica puede ser, por ejemplo, una lipasa, una fosfolipasa, una esterasa o una cutinasa. Las enzimas lipolíticas pueden ser enzimas lipolíticas que tienen un pliegue de hidrolasa α/β . Estas enzimas tienen típicamente una tríada catalítica de residuos de serina, ácido aspártico e histidina. Las α/β hidrolasas incluyen lipasas y cutinasas. Las cutinasas muestran poca o ninguna activación interfacial, donde las lipasas a menudo experimentan un cambio conformacional en presencia de una interfaz lípido-agua (Longhi y Cambillau (1999) *Biochimica et Biophysica Acta* 1441:185-96). Un fragmento activo de una enzima lipolítica es una porción de una enzima lipolítica que retiene la capacidad de degradar lípido. Un fragmento activo retiene la tríada catalítica. Tal y como se utiliza en este documento, la actividad lipolítica se puede determinar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica (véase, p. ej., Gupta *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37:63-71, 2003; Pat. EE. UU. n.º 5,990,069; y Patente Internacional n.º WO 96/1 8729A1).

10 **[0028]** En algunos casos, las enzimas lipolíticas de la presente exposición son α/β hidrolasas. En algunos casos, las enzimas lipolíticas de la presente exposición son lipasas. En algunos casos, las enzimas lipolíticas de la presente exposición son cutinasas.

Posiciones productivas de enzimas lipolíticas

20 **[0029]** La invención proporciona posiciones de aminoácido en una enzima lipolítica que pueden ser útiles en una composición detergente en la que las modificaciones favorables dan como resultado un índice de rendimiento mínimo en relación con el rendimiento de lavado, la hidrólisis de sustrato, la estabilidad de la enzima en composiciones detergentes y la termoestabilidad de la enzima, al tiempo que presentan al menos una de estas características mejorada a partir de una enzima lipolítica original. Estas modificaciones se consideran modificaciones adecuadas.

25 **[0030]** La estabilidad de las enzimas lipolíticas de la presente exposición puede compararse con la estabilidad de un patrón, por ejemplo, la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL de SEQ ID NO:3.

30 **[0031]** Los términos "estabilidad térmica" y "termoestabilidad" hacen referencia a lipasas de la presente exposición que retienen una cantidad específica de actividad enzimática tras una exposición a una temperatura identificada, normalmente a lo largo de un periodo de tiempo determinado en condiciones que se mantienen durante el proceso lipolítico, de hidrólisis, de limpieza o cualquier otro proceso descrito en la presente memoria, por ejemplo, mientras se expone a temperaturas modificadas. Las temperaturas modificadas incluyen temperaturas más altas o más bajas. En algunos casos, las lipasas retienen al menos aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 99 % de actividad lipolítica después de ser expuestas a temperaturas modificadas durante un periodo de tiempo determinado, por ejemplo, al menos aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 120 minutos, aproximadamente 180 minutos, aproximadamente 240 minutos, aproximadamente 300 minutos, etc.

40 **[0032]** Tal y como se utiliza en este documento, las propiedades mejoradas de una variante de enzima lipolítica incluyen una variante de enzima lipolítica con un rendimiento de lavado o limpieza mejorado o potenciado, y/o una estabilidad mejorada o potenciada opcionalmente con un rendimiento de lavado o limpieza conservado, en relación con la enzima lipolítica original correspondiente (por ejemplo, enzima lipolítica de tipo salvaje o natural). Las propiedades mejoradas de una variante de enzima lipolítica pueden comprender un rendimiento de lavado o limpieza mejorado y/o una estabilidad mejorada y/o una hidrólisis de sustrato mejorada y/o una expresión mejorada. En algunos modos de realización, la invención proporciona variantes de enzimas lipolíticas de la invención que muestran una o más de las siguientes propiedades: rendimiento de lavado a mano mejorado, rendimiento de lavado de vajilla de forma manual o a mano mejorado, rendimiento de lavado de vajilla de forma automática mejorado, rendimiento de lavado de ropa mejorado y/o estabilidad mejorada en comparación con una enzima lipolítica original de referencia (p. ej., enzima lipolítica de tipo salvaje, como una lipasa de tipo salvaje).

50 **[0033]** Las posiciones de aminoácido de enzima lipolítica que se consideran posiciones útiles pueden tener diferentes modificaciones adecuadas para su uso en una composición detergente. Las modificaciones pueden incluir una inserción, delección o sustitución en la posición particular. Por ejemplo, una modificación es una sustitución. Para cada posición, un mayor número de posibles modificaciones adecuadas da como resultado una puntuación de productividad más alta para la posición. Por ejemplo, las posiciones de aminoácido pueden tener al menos un 50 %, 30 % o 15 % de las modificaciones probadas en una posición productiva como modificaciones adecuadas, donde la modificación cumple al menos con uno de los siguientes criterios de idoneidad:

a) una posición en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de p-nitrofenilo

a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,9 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,0;

b) una posición en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de p-nitrofenilo a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,2; o

c) una posición en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de p-nitrofenilo a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,5 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,5.

[0034] Las posiciones de enzimas lipolíticas descritas en este documento que tienen al menos el 50 % de las modificaciones probadas como modificaciones adecuadas incluyen las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 46, 51, 52, 54, 58, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 75, 90, 93, 94, 111, 120, 122, 123, 130, 131, 137, 140, 162, 163, 189, 250, 252 y 264, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4 .

[0035] Las modificaciones de enzimas lipolíticas expuestas en la presente memoria que tienen al menos el 50 % de las modificaciones probadas como modificaciones adecuadas incluyen las modificaciones 1(E,A,C,D,F,I,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,V,W,Y); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); y 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0036] Las posiciones de enzimas lipolíticas expuestas en este documento que tienen al menos el 30 %, pero menos del 50 % de las modificaciones probadas como modificaciones adecuadas incluyen las posiciones 18, 19, 20, 30, 31, 32, 47, 48, 49, 50, 53, 56, 60, 73, 74, 85, 86, 91, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 115, 125, 127, 128, 132, 133, 151, 159, 164, 179, 183, 187, 188, 190, 216, 223, 232, 237, 244, 251, 254, 263, 267 y 269, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0037] Las modificaciones de enzimas lipolíticas expuestas en la presente memoria que presentan al menos el 30 % de las modificaciones probadas como modificaciones adecuadas incluyen las modificaciones 1(E,A,C,D,F,I,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,V,W,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 85(S,F,H,I,N,Q,T); 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W);

125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y);
 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V);
 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 151(L,I,M,N,P,T,V,W);
 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V);
 5 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T);
 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V);
 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T);
 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 254(D,A,H,K,N,P,T); 256(P,A,D,S,T);
 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 267(T,G,I,L,M,P,W); y 269(L,D,F,M,Q,V,W), donde las
 10 posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de
 aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0038] Las posiciones de enzimas lipolíticas expuestas en este documento que tienen al menos el 15 %, pero
 menos del 30 % de las modificaciones probadas como modificaciones adecuadas incluyen las posiciones 7, 11,
 12, 15, 22, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 61, 63, 65, 67, 76, 77, 84, 87, 114, 117, 119, 121, 134, 135, 136, 143, 154, 155,
 15 156, 158, 165, 166, 168, 176, 180, 191, 199, 200, 202, 209, 211, 214, 217, 221, 224, 225, 228, 229, 231, 233, 248,
 249, 253, 255, 256, 265 y 268, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por
 correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en
 SEQ ID NO: 4.

[0039] Las modificaciones de enzimas lipolíticas expuestas en la presente memoria que tienen al menos el 15 %
 de las modificaciones probadas como modificaciones adecuadas incluyen las modificaciones
 1 (E,A,C,D,F,I,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 15(Q,G,H,M,S); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T);
 25 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W);
 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y);
 30 40(A,F,M,S,W); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T); 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W);
 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W);
 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,V,W,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R);
 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y); 67(L,H,I,Q,V);
 35 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y);
 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S);
 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W);
 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q);
 40 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W);
 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V); 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q);
 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T);
 128(V,C,H,I,L,N,S,T,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,V,W,Y);
 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T); 136(P,D,Q,R);
 45 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 143(T,A,G,N,S); 151(L,I,M,N,P,T,V,W);
 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y); 166(I,D,G,W);
 168(V,G,L,Q); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y);
 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V);
 50 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 209(R,H,S,T); 211(F,I,R,T,W); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 217(S,H,K,V); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 227(L,C,H,M);
 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 231(T,G,H,K,L,M); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y);
 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 248(N,D,L,Y); 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y);
 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T);
 55 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); y
 269(L,D,F,M,Q,V,W), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por
 correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ
 ID NO: 4.

[0040] Las posiciones de enzimas lipolíticas expuestas en este documento que tienen al menos una modificación,
 pero menos del 15 % de las modificaciones probadas como modificaciones adecuadas incluyen las posiciones 14,
 16, 17, 34, 41, 55, 57, 59, 62, 70, 79, 92, 100, 102, 103, 106, 109, 110, 112, 118, 126, 138, 139, 142, 149, 152,
 153, 167, 169, 170, 181, 184, 192, 193, 196, 198, 205, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 226, 227, 230, 236, 238, 239,
 242, 243, 246, 257, 259, 260, 262 y 266, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están

numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0041] Las modificaciones de enzimas lipolíticas expuestas en la presente memoria que tienen al menos una modificación probada como modificación adecuada incluyen las modificaciones

5 1(E,A,C,D,F,I,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 14(A,S,V); 15(Q,G,H,M,S); 16(Y,H,W); 17(S,E); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W);
 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W);
 10 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y);
 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y);
 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 34(I,P); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y);
 40(A,F,M,S,W); 41(C,V); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T); 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W);
 15 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W);
 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,V,W,Y); 55(F,G,W); 56(E,H,K,R,T,V); 57(D,S); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 59(G,D);
 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R); 62(D,N); 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y);
 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y); 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 70(D,S);
 20 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S);
 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 79(S,A,M); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 92(N,A,T);
 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V);
 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 100(I,M); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 102(D,H); 103(I,Y);
 25 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 106(G,H); 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 109(G,T); 110(H,N,S); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W);
 112(G,F,Q); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V); 118(R,P); 119(S,D,I,Q,T,V);
 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y);
 126(Q,I,M); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y);
 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T);
 30 136(P,D,Q,R); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 138(Y,F); 139(RLT); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T);
 142(F,H,Y); 143(T,A,G,N,S); 149(G,A); 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 152(A,I,V); 153(T,S); 154(V,F,I,L,M,Y);
 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y);
 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y); 166(I,D,G,W); 167(D,N); 168(V,G,L,Q); 169(F,S,Y);
 170(S,G); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T); 181(F,L); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 184(F,W,Y);
 35 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V);
 192(T,N,P); 193(L,T); 196(I,V); 198(H,G,S); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 205(R,D); 206(L,N);
 208(P,E,N); 209(R,H,S,T); 210(E,S); 211(F,I,R,T,W); 212(G,Q); 213(Y,S); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 217(S,H,K,V); 218(P,T); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 226(T,D,N);
 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 230(V,W); 231(T,G,H,K,L,M); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W);
 40 233(N,D,G,H,Q); 236(V,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 238(I,V); 239(E,K); 242(D,T); 243(A,S); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S);
 246(G,I); 248(N,D,L,Y); 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y);
 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T);
 257(A,W,Y); 259(L,W,Y); 260(W,P); 262(F,D,K); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T);
 265(I,L,M,Q,R,W); 266(G,E); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); y 269(L,D,F,M,Q,V,W), donde las posiciones de
 45 aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0042] Algunas modificaciones de enzimas lipolíticas adicionales de la presente exposición que tienen una modificación adecuada incluyen las modificaciones 11(A,E,I), 23(A), 24(Q,S), 27(K,L), 29(N), 30(E,G,I,S,Y), 31(T), 33(C,I,P,T,V), 45(A,G,S,T), 48(N,R,T,V), 49(C,Y), 50(M), 51(H,V), 56(A,M,N,S), 58(A,F), 71(C,F,P), 73(Q,T), 74(I,M,T,W), 75(K), 91(K,N,Y), 94(A,H), 101(A), 108(A), 111(G,H,I,K,M,S,Y), 122(K,L,Q), 128(T,V), 130(K,M), 133(D,H,L,W), 135(A,D,M,N,Y), 140(Y), 159(G), 163(Q), 183(C), 187(C,I), 188(A,M,W), 190(W), 227(A,I,S), 233(F,I,V), 251(V) y 252(M,V).

[0043] Estas posiciones de aminoácido pueden considerarse posiciones útiles para modificaciones combinatorias en una enzima lipolítica original. Por lo tanto, las enzimas lipolíticas pueden presentar una o más modificaciones en cualquiera de las posiciones anteriores.

Modificaciones adecuadas de enzimas lipolíticas

[0044] La invención incluye variantes de enzima de enzimas lipolíticas que presentan una o más modificaciones a partir de una enzima lipolítica original. Las variantes de enzima pueden ser útiles en una composición detergente con un índice de rendimiento mínimo en relación con el rendimiento de lavado, la estabilidad de la enzima en composiciones detergentes y la termoestabilidad de la enzima, al tiempo que presentan al menos una de estas características mejorada a partir de una enzima lipolítica original.

[0045] Las modificaciones de enzimas lipolíticas de la presente exposición que cumplen con los tres criterios de idoneidad incluyen 1 (A,D,F,I,N,P,S,W,Y), 2 (I,L), 3 (D,G,Y), 4 (D,F,W), 5 (H,I,L,S,T,V,Y), 6 (I,T), 7 (Y), 8 (G,H,I,L,M,T,V,W,Y), 9 (H,K), 11 (V), 13 (H,N), 14 (S), 16 (W), 17 (E), 18 (K), 19 (G), 20 (T), 23 (D,E,H,I,K,N,Q,T,V), 24 (A,D,E,H,I,L,N,P,T,V,W), 25 (I,L,T), 26 (G,K,M,S,T,V,W,Y), 27 (A,E,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y), 28 (D,E,I,N,S), 29 (E,H,K,L,M,R,T,V), 31 (D,H,S), 33 (D,E,F,L,Q,R,S), 34 (P), 37 (D,E,G,I,K,P,Q,W), 38 (D,F,H,I,K,L,M,N,Y), 39 (E,H,I,L,S,V), 40 (M,S), 42 (G,I,W), 43 (R,T), 44 (I), 45 (F,V), 46 (D,L,M), 47 (H), 48 (E,H,P,Q), 49 (V), 50 (L,R,S), 51 (A,E,G,I,L,M,S), 52 (A,G,I,V), 54 (P,T,V), 56 (H,K,R,T), 58 (M), 60 (G), 63 (T), 64 (G), 66 (H,M,W), 67 (I,V), 68 (G,I,S,T,V), 69 (I,K,S,T), 70 (S), 71 (D,H,K,Q,R,S,T), 72 (A,D,E,F,H,I,L,N,R,S,V,Y), 73 (H,R,S), 74 (H,S), 75 (A,E,G,H,I,Q,S,T,V), 79 (A), 85 (T), 86 (P,T), 87 (G), 90 (A,E,F,N), 91 (E,H,I,M,Q,R), 92 (T), 94 (R), 95 (G,Q,V,W), 96 (A,K), 97 (D,T), 98 (Q), 99 (D,S,T,W), 101 (D,H,Y), 105 (K), 108 (K,Q,Y), 111 (A,E,L,Q,T,V), 114 (F,I,M,V), 115 (T), 118 (P), 119 (T), 120 (Y), 121 (K), 122 (H,I), 123 (G,M,N,W), 125 (G,Q), 127 (G,T), 130 (A,G,H,T), 131 (H,I,Q), 132 (H,R), 134 (L,V), 135 (K), 137 (E,G,H,K,Q,T,Y), 139 (T), 151 (I,T,V), 154 (I,L), 155 (G,S), 158 (E,F), 162 (G,R), 163 (N,P,Y), 164 (V), 166 (G), 176 (I,L), 179 (L,Q,V), 180 (K), 181 (L), 187 (G,H,L,N,Q,S,T,W), 188 (C,T), 189 (D,G,N,Q,R,S), 191 (F,L,V), 196 (V), 199 (G), 202 (P,V), 208 (E), 211 (I,W), 216 (N,W), 217 (K), 223 (Q,S,T,V), 225 (E,K,R), 227 (M), 228 (R), 232 (I,M,T), 233 (D,G,H,Q), 237 (I,L,Y), 242 (T), 244 (I), 250 (Q,R), 251 (D,W), 252 (A,D,G,H,Q,R,S,T), 255 (L), 256 (A,S), 257 (Y), 262 (D), 264 (E,M,N,P,Q,R), 265 (M,Q), 267 (L,W) y 269 (D,M,Q,V,W), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO:4.

[0046] Las modificaciones de enzimas lipolíticas de la presente exposición que cumplen con los criterios de idoneidad a) y b), pero no con el c) incluyen 1 (Q,T), 2 (F,G,M,P), 3 (K,T), 4 (A,G,I,K,L,M,N,R,S), 5 (K,W), 6 (E,M), 8 (A,E), 9 (E,G,N,R), 11 (H,K,Y), 12 (F,H,V), 13 (Q), 15 (S), 18 (Q), 19 (C), 20 (G,S), 23 (C,F,L,M,S,W), 24 (Y), 25 (C,H,K), 26 (C), 27 (F), 28 (H,M,P,Q,R), 29 (Q,W,Y), 30 (D,V), 31 (E,Q), 32 (A,I,M,R,S), 35 (K), 37 (C), 38 (V,W), 39 (P,T,Y), 40 (W), 42 (V), 43 (D,M), 45 (Q), 46 (F,G,V,W), 47 (T), 50 (A), 51 (N,R,T), 52 (E,R,W), 53 (E,G,H,K,S), 54 (R,Y), 55 (G), 56 (V), 64 (C,E,N,V), 66 (N,Q,R), 67 (Q), 69 (A,G,H,N,W), 71 (V,W,Y), 72 (P), 73 (E,G,K), 74 (N,Q), 75 (D,N,R,Y), 76 (H), 77 (I,L,N,T), 86 (L,M), 87 (P,V), 90 (Q,T), 91 (F), 94 (D), 97 (Q), 98 (D,E,I), 99 (K), 105 (A,D,E,P), 108 (E,M), 122 (E,N), 123 (E,L,Q), 125 (N,T), 126 (I), 127 (E,F,R), 128 (H,S), 130 (F,Q), 131 (R,W,Y), 132 (D,K,W), 133 (E,Q), 135 (F,T), 136 (D,Q), 137 (S,V), 139 (L), 140 (F,M,Q,T), 143 (A,G,S), 149 (A), 151 (N), 154 (F), 156 (F,W), 158 (Y), 159 (E), 163 (S,W), 164 (N,S), 165 (I), 166 (D,W), 167 (N), 168 (L), 179 (E,I), 183 (V), 188 (H), 189 (K,V), 200 (A), 205 (D), 209 (S,T), 214 (D), 216 (G,Q), 217 (H), 218 (T), 223 (M), 226 (N), 228 (E), 229 (K), 231 (K,L,M), 252 (K,L,N), 254 (H), 255 (F), 256 (T), 263 (I,V), 264 (H,S,T), 267 (P) y 269 (F), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO:4.

[0047] Las modificaciones de enzimas lipolíticas de la presente exposición que cumplen con los criterios de idoneidad a) o tanto b) como c), pero no con los tres incluyen 1 (E,R,V), 2 (V,H,T), 3 (S,E,Q), 4 (Q,Y), 5 (D), 6 (L,Q,V), 7 (F), 8 (N), 9 (Q,A,I), 11 (N), 12 (L), 13 (F), 14 (A), 15 (Q), 16 (Y), 17 (S), 18 (A,C,H,S), 19 (A,T), 20 (A,P), 22 (C), 23 (G,P), 24 (K,F), 25 (N,A,D,G,V,W), 26 (N,L,Q), 27 (D), 28 (A,F,G,L), 29 (P,C,I), 30 (A,H,R,W), 31 (G), 32 (T,Q), 33 (N,K), 34 (I), 35 (T,E,R), 37 (T,A,F,L,M), 38 (G,T), 39 (N), 40 (A), 41 (C), 42 (P), 43 (E,I), 44 (V,H,T), 45 (E), 46 (K,E), 47 (A,D,E,F,M), 48 (D), 49 (A,H,K), 50 (T,D,W), 51 (F), 52 (L,T), 53 (Y,L,W), 54 (S), 55 (F), 56 (E), 57 (D), 58 (S,G,H,K,Q,W), 59 (G), 60 (V), 61 (G,L), 62 (D), 63 (V), 64 (T,D,I,L), 65 (G,V), 66 (F,I,L,V), 67 (L), 68 (A,C,W), 69 (L), 70 (D), 71 (N,E), 72 (T,K), 73 (N), 74 (K,A,D,G), 75 (L), 76 (I,V), 77 (V,A), 79 (S), 84 (R), 85 (S,H,N,Q), 86 (I,V,Y), 87 (E,D), 90 (I,V), 91 (G), 92 (N), 93 (L,D,K,Q,R), 94 (N,G,T,V), 95 (F,K,L), 96 (D), 97 (L,A,M), 98 (K,H), 99 (E), 100 (I), 101 (N), 102 (D), 103 (I), 105 (S,W), 106 (G), 108 (R,F), 109 (G), 110 (H,S), 111 (D), 112 (G), 114 (T), 115 (S,G,M,R,V), 117 (W,H,V), 118 (R), 119 (S,D,I), 120 (V,G,H,N,S,W), 121 (A), 122 (D,A,F), 123 (T), 125 (R,Y), 126 (Q), 127 (K), 128 (V,C,I), 130 (D,V,W,Y), 131 (A,K,S,T), 132 (V,Q), 133 (R,I), 134 (E), 135 (H), 136 (P), 137 (D,I,R,W), 138 (Y), 139 (R), 140 (V), 142 (F,H,Y), 143 (T), 149 (G), 151 (L,M,W), 152 (A), 153 (T,S), 154 (V), 155 (A), 156 (G,M), 158 (D), 159 (L,Q,R), 162 (N,D,E,F,H,I,K,Q,S), 163 (G,F,L), 164 (Y), 165 (D), 166 (I), 167 (D), 168 (V,G), 169 (F,S), 170 (S), 176 (V), 179 (R,H,K), 180 (A,T), 181 (F), 183 (E), 184 (F,Y), 187 (V), 188 (Q), 189 (T), 190 (G), 191 (G), 192 (T), 193 (L,T), 196 (I), 198 (H,G,S), 199 (T), 200 (N,S), 202 (I,L), 205 (R), 206 (L), 208 (P), 209 (R,H), 210 (E), 211 (F,R,T), 212 (G), 213 (Y), 214 (S,A), 216 (S,V), 217 (S,V), 218 (P), 221 (W), 223 (K,A), 224 (S), 225 (G), 226 (T), 227 (L,H), 228 (V), 229 (P), 230 (V,W), 231 (T,H), 232 (R,P), 233 (N), 236 (V), 237 (K,H,T,W), 238 (I), 239 (E), 242 (D), 243 (A), 244 (T,Q,S), 246 (G), 248 (N), 249 (Q), 250 (P,S), 251 (N), 252 (I,C,E), 253 (P,R), 254 (D,T), 255 (I), 256 (P), 257 (A), 259 (L), 260 (W), 262 (F), 263 (G,K), 264 (L,C,G), 265 (I), 266 (G), 267 (T,G,M), 268 (C,H) y 269 (L), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO:4.

[0048] Las modificaciones de enzimas lipolíticas de la presente exposición que cumplen con el criterio de idoneidad b) solo (cumplen con el b) pero no con el a) ni el c)) incluyen 2 (K), 3 (A,H), 4 (P), 6 (K,Y), 7 (H), 9 (D,W), 12 (W), 13 (A,M,Y), 15 (M), 16 (H), 20 (Q), 22 (H), 23 (R), 25 (S), 29 (G,S), 30 (L,N), 33 (M), 37 (H), 39 (Q), 40 (F), 47 (W), 48 (G), 50 (F,K), 51 (D,P,Y), 52 (M), 54 (F,G,K,W), 55 (W), 58 (I), 60 (L), 64 (K,R,Y), 65 (L), 66 (G,Y), 67 (H), 68 (Y), 69 (D), 75 (M), 84 (H), 86 (Q), 90 (Y), 92 (A), 93 (I,P,V), 94 (S), 95 (H,T), 96 (V), 98 (M), 100 (M), 115 (N), 117 (Q), 122 (S,T,Y), 125 (I), 126 (M), 127 (D), 128 (Y), 130 (C,R), 132 (I), 134 (P), 140 (C), 151 (P), 152 (V), 156 (T), 164 (D,R), 165 (Y), 188 (F), 208 (N), 213 (S), 216 (D), 227 (C), 229 (I), 232 (C,L), 237 (E), 249 (E), 250 (E), 252 (F), 254 (A,K), 257 (W) y 267 (I), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas

por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO:4.

[0049] Las modificaciones de enzimas lipolíticas de la presente exposición que cumplen con el criterio de idoneidad c) solo (cumplen con el c) pero no con el a) ni el b)) incluyen 1 (C,L), 3 (R), 6 (A,H), 7 (M,V), 8 (K), 9 (Y), 13 (K,T,V), 14 (V), 15 (G,H), 18 (M,N,W), 19 (I,L,V,W), 20 (I), 22 (L,M), 24 (M,R), 25 (E), 31 (M,P,V), 37 (R,Y), 38 (A,E), 39 (C,W), 41 (V), 42 (C), 48 (L), 49 (G,L,W), 54 (E,H,M), 57 (S), 58 (D,R), 59 (D), 60 (K,Y), 61 (A,D,R), 62 (N), 63 (K,Q), 65 (Y), 66 (A,S,T), 74 (E), 76 (S), 79 (M), 84 (Q,W), 85 (F,I), 87 (A), 93 (H,N,W), 94 (K,M,P), 96 (P,R), 97 (I), 99 (P,Q), 101 (C,E,M), 102 (H), 103 (Y), 105 (F), 106 (H), 109 (T), 110 (N), 111 (F,W), 112 (F,Q), 115 (I,L), 117 (K), 119 (Q,V), 120 (I), 121 (Q), 123 (I,K), 125 (C), 128 (L,N,W), 130 (E), 131 (C,N), 132 (C), 133 (F,N,V), 136 (R), 137 (A,F,L,M,N,P), 138 (F), 140 (E,I,L,N), 143 (N), 152 (I), 154 (M,Y), 155 (T), 159 (M,W), 162 (M,P,Y), 163 (A,M,R), 165 (P), 168 (Q), 169 (Y), 170 (G), 176 (F,N,W), 180 (D,Q), 183 (H,M,Q,S,T,Y), 184 (W), 188 (E,R), 189 (E,M), 190 (D,H,R,S,Y), 192 (N,P), 199 (N,V), 200 (P), 202 (M), 206 (N), 210 (S), 212 (Q), 214 (M), 221 (F,G,Y), 223 (H,L), 224 (A,F,P), 225 (C), 226 (D), 228 (A), 229 (M,S), 231 (G), 232 (D,W), 236 (W), 238 (V), 239 (K), 243 (S), 244 (A,F,L,M,P), 246 (I), 248 (D,L,Y), 249 (G,T), 250 (D,G,K,T), 251 (M,Q,S,T,Y), 252 (W), 253 (F,H,N), 254 (N,P), 255 (W), 256 (D), 259 (W,Y), 260 (P), 262 (K), 263 (C,H,M), 265 (L,R,W), 266 (E) y 268 (D,N), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO:4.

Modificaciones de superficie

[0050] La exposición incluye variantes enzimáticas de enzimas lipolíticas que tienen una o más modificaciones en un aminoácido expuesto a una superficie. Las modificaciones de superficie en las variantes enzimáticas pueden ser útiles en una composición detergente al tener un índice de rendimiento mínimo para el rendimiento de lavado, la estabilidad de la enzima en composiciones detergentes y la termoestabilidad de la enzima, mientras que presentan al menos una de estas características mejorada a partir de una enzima lipolítica original. En algunos casos, la modificación de superficie cambia la hidrofobicidad y/o la carga del aminoácido en esa posición. La hidrofobicidad puede determinarse mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, como las descritas en White y Wimley (White, S.H. y Wimley, W.C., (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:319-65.

[0051] En el sentido en que se utiliza en la presente memoria, "propiedad de superficie" se puede utilizar en referencia a una carga electrostática, así como a propiedades como la hidrofobicidad e hidrofiliidad que presenta la superficie de una proteína.

[0052] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen al menos una de las modificaciones de superficie como modificaciones adecuadas incluyen las posiciones 18, 27, 29, 33, 51, 58, 72, 75, 101, 108, 114, 121, 135, 137, 156, 163, 187, 250, 252 y 264, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0053] Las modificaciones de enzimas lipolíticas que tienen al menos una de las modificaciones de superficie como modificaciones adecuadas incluyen las modificaciones A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, F051T, S058M, T072R, L075Q, N101D, R108K, R108Q, R108Y, T114F, T1141, A121K, H135F, D137V, G156W, G163Y, V187N, V187W, P250E, I252A, I252T o L264P, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0054] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen al menos una de las modificaciones de superficie como modificaciones adecuadas donde el cambio es un cambio en la hidrofobicidad (pero no en la carga) incluyen las posiciones 18, 27, 29, 33, 51, 58, 72, 75, 101, 108, 114, 121, 135, 137, 156, 163, 187, 250, 252 y 264, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0055] Las modificaciones de enzimas lipolíticas que tienen al menos una de las modificaciones de superficie como modificaciones adecuadas donde el cambio es un cambio en la hidrofobicidad (pero no en la carga) incluyen las modificaciones A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, F051T, S058M, T072R, L075Q, N101D, R108K, R108Q, R108Y, T114F, T1141, A121K, H135F, D137V, G156W, G163Y, V187N, V187W, P250E, I252A, I252T o L264P, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0056] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen al menos una de las modificaciones de superficie como modificaciones adecuadas donde el cambio es un cambio en la carga (pero no en la hidrofobicidad) incluyen la posición 18, 27, 29, 33, 72, 101, 108, 121, 137 y 250, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0057] Las modificaciones de enzimas lipolíticas que tienen al menos una de las modificaciones de superficie como modificaciones adecuadas donde el cambio es un cambio en la carga (pero no en la hidrofobicidad) incluyen las

modificaciones A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, T072R, N101D, R108Q, R108Y, A121K, D137V o P250E, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

5 **[0058]** Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la estabilidad del detergente son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para el rendimiento detergente con la mitad de la dosis son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 1 (S), 5 (H, I, S, T), 8 (H), 9 (K, N), 11 (H, K), 13 (N), 19 (G), 23 (K, N, Q, R), 27 (Q, R), 29 (K, R), 32 (A), 33 (D), 37 (G, H, Q), 38 (F, L, M, W, Y), 39 (I, L), 42 (W), 43 (D, I, R, T), 45 (F, Q, V), 51 (M), 53 (E), 54 (P), 56 (H, K, R), 58 (H, K, Q, W), 69 (R), 73 (R), 75 (A, R), 75 (T), 77 (I, L, T), 90 (F, T), 91 (I, Q), 94 (R), 105 (P), 108 (K), 122 (F), 125 (T), 130 (A, R), 132 (K, R), 134 (L), 137 (R), 151 (T), 155 (S), 156 (W), 163 (F, P), 164 (R), 180 (K), 183 (V), 184 (Y), 187 (G, H, N, Q, S, T, W), 189 (G, Q), 211 (I), 214 (A), 228 (R), 232 (P), 233 (Q), 244 (I), 252 (N) y 265 (Q), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

20 **[0059]** Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la estabilidad del detergente son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para el rendimiento detergente con la mitad de la dosis con adyuvante son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 1 (S), 3 (T), 4 (F), 5 (H, I, S, T), 8 (H, T, V), 9 (G, H, K), 11 (K), 12 (V, W), 18 (K), 19 (G), 23 (K, Q, R), 27 (R, S), 32 (I), 38 (F, L, M, W, Y), 39 (I, P), 43 (I, R, T), 45 (F, Q), 53 (K), 54 (P), 56 (K, R), 58 (H, Q), 75 (G, Q, R), 77 (I), 90 (T), 91 (I, Q), 105 (P), 123 (N), 127 (F), 130 (A, F, H, Q, R), 131 (R), 136 (Q), 137 (R, S), 143 (S), 156 (T), 162 (G), 163 (S), 164 (R, V), 166 (G), 180 (K), 187 (G, H, N, Q, S, T, W), 188 (F), 189 (D, G), 199 (G), 228 (R), 252 (N), 264 (R) y 265 (Q), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

30 **[0060]** Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la estabilidad del detergente son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para el rendimiento detergente con una dosis completa son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 1 (S), 5 (H, I, T), 23 (E, Q), 29 (H, I, R, T), 39 (H, I), 43 (R, T), 54 (T), 58 (Q), 115 (T), 130 (A, R), 154 (L), 158 (E), 180 (K), 187 (T), 228 (R) y 269 (W), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

40 **[0061]** Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la hidrólisis del sustrato de pNPO a un pH 8 son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la termoestabilidad son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 2 (I), 11 (K), 15 (S), 18 (K), 23 (C, D, E, F, H, I, K, M, N, Q, S, T, V), 24 (H), 26 (T), 27 (A, G, H, N, Q, R, S, T, V), 29 (E), 37 (P), 48 (E, Q), 50 (S), 51 (A, I, L, S, T), 56 (K, V), 58 (M), 66 (N, Q), 75 (A, G, Q, R), 77 (I, T), 91 (E, Q), 94 (R), 96 (K), 99 (D, S), 101 (D, H), 108 (K, M, Y), 111 (A, E, Q), 114 (F, I, V), 117 (Q), 120 (N), 121 (K), 135 (F), 137 (I, Q, R), 154 (F, I, L), 155 (G, S), 156 (W), 163 (F), 169 (S), 176 (I), 187 (H, N, W), 226 (N), 250 (E), 252 (A), 256 (T), 264 (C, H, M, P, Q, S), 265 (M) y 269 (Q), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

50 **[0062]** Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la hidrólisis del sustrato de pNPO a un pH 8 son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la estabilidad del detergente son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 12 (F), 13 (Q), 15 (S), 19 (C, G), 20 (P), 23 (D, E, F, I, V), 24 (W), 26 (C, T, W, Y), 28 (D, P), 31 (E), 34 (P), 37 (C, D), 39 (E, L, P), 42 (I, V), 45 (F, V), 46 (F, G, L, W), 47 (F, M, T, W), 49 (H, V), 51 (A, G, I, L, M, S, T), 60 (L), 64 (V), 66 (Q), 68 (S, T, V), 73 (E, G, R, S), 75 (E, G, Q, R), 77 (A, L, N, T), 91 (E, Q), 94 (D), 108 (E, F, M, Q, Y), 114 (F, I, V), 127 (T), 128 (H, S, Y), 131 (R, W, Y), 132 (D), 133 (E, Q), 136 (D, Q), 139 (M), 140 (F, M, Q), 142 (Y), 154 (I), 155 (S), 156 (W), 159 (E, R), 163 (F, L, P, Y), 168 (G, L), 179 (L), 187 (H, N, Q, T), 188 (F), 189 (D), 205 (D), 208 (E), 209 (S), 214 (D), 223 (T), 225 (E), 228 (E), 237 (L, Y), 250 (E), 251 (D), 252 (A), 256 (T), 264 (C, H, P, Q, S) y 265 (M), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0063] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la hidrólisis del sustrato de pNPO a un pH 8 son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la estabilidad de LAS son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 1 (F, R), 4 (K, L, N, W), 5 (K), 11 (K), 23 (K), 27 (A, H, N, R, S, T, V), 37 (P), 38 (H, K, L, W, Y), 42 (V), 43 (I, R), 45 (F, Q, V), 47 (T), 49 (V), 51 (I, M, S), 56 (H, K, S, T), 58 (M, Q), 73 (S), 75 (D, E, G, Q, R), 91 (Q), 94 (R), 101 (D), 108 (K), 111 (A), 119 (D, T), 120 (Y), 154 (I), 179 (L), 187 (T), 189 (D, Q), 200 (A), 209 (S), 211 (W), 226 (N), 250 (E, Q), 251 (W), 252 (A) y 256 (T), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0064] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la hidrólisis de pNPB son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 2 (I, L), 3 (D), 4 (D, I, L, W), 5 (H, Y), 8 (H, M), 9 (K), 11 (H, K), 18 (K), 23 (K), 24 (A, T), 26 (K, T), 27 (A, I, Q, T), 29 (H, I, K, R, T, V), 30 (R, V), 32 (S), 35 (K), 37 (G), 40 (M), 54 (V), 69 (A, K), 71 (R), 72 (L), 74 (A), 75 (M, S), 91 (I), 94 (R), 101 (Y), 108 (K, Y), 111 (L, T, V), 114 (I), 122 (T, Y), 123 (Q), 125 (Q), 130 (F, H), 132 (H, W), 134 (L, V), 137 (H, K, S, T, W, Y), 151 (T, W), 155 (G), 156 (W), 162 (G), 163 (Y), 166 (G), 176 (I), 180 (K), 187 (H, S, T, W), 189 (K), 232 (L, P), 233 (D, H), 237 (L, Y), 244 (I), 252 (L, T), 255 (L), 263 (I, V), 265 (M) y 269 (M), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0065] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la hidrólisis de pNPO son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 1 (D), 2 (L), 3 (D, T), 4 (A, D, L, M), 5 (H, Y), 8 (A, E, M), 9 (R), 18 (K), 23 (D, E, F, N, Q), 24 (A, D, E, H, N, T), 26 (G, K), 27 (A, E, I, N, Q, T), 29 (E, Q, R), 33 (D, E, F, M, Q, R, S), 37 (D, E, P, Q), 38 (D, N), 40 (M), 48 (E, Q), 49 (V), 50 (E, F), 51 (I, L, T), 54 (F, R), 56 (H, K, R, T), 58 (M, Q), 64 (N), 66 (Q), 74 (Q), 75 (E, M, N, Q, R), 77 (A, I, L, T), 87 (P), 90 (E, F, Q), 101 (D), 105 (D, P), 108 (K, Q, Y), 111 (A, E, L, Q, T), 114 (F, M), 115 (R), 117 (Q), 120 (N), 122 (Y), 123 (E, L, M, N, Q), 125 (Q), 127 (E, F, R), 130 (A, F, H, Q), 132 (K, Q, R), 134 (L), 137 (E, G, H, I, K, Q, R, S, T, V, W, Y), 154 (F, L), 155 (G, S), 156 (F, W), 158 (E, F, Y), 162 (G, R), 163 (F, P, S, W, Y), 169 (S), 176 (I), 180 (K), 187 (H, N, Q, S, T, W), 189 (D, Q, R), 225 (E), 227 (M), 228 (E), 232 (P), 233 (D, G, Q), 264 (E, M, N, P, Q, R, S, T), 265 (M) y 269 (M, Q), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0066] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la hidrólisis de pNPP son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 1 (Q, S), 3 (D, T), 4 (A, D, L, M), 5 (H, S, Y), 9 (M), 11 (K), 12 (F), 15 (S), 23 (F), 27 (E, N, Q, T), 29 (R), 32 (A, Q, S), 33 (D, Q), 35 (E, K, R), 40 (M), 48 (Q), 51 (I, L, M, T), 56 (H, K, R, T), 58 (M, Q), 71 (E), 75 (R), 77 (I, T), 87 (P), 105 (A), 108 (K), 111 (A, L), 114 (M), 115 (R), 127 (E, F), 130 (A), 132 (Q, R, W), 134 (L), 137 (E, G, H, I, K, Q, R, S, Y), 143 (A), 155 (S), 162 (G), 163 (F, P, S, W, Y), 164 (D, R), 165 (I, Y), 187 (H, N, Q, S, W), 189 (R), 225 (E), 227 (A, M), 232 (P), 233 (Q), 244 (I), 252 (A, K, L, R), 263 (I, V), 264 (H, R, T) y 269 (V), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0067] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la hidrólisis de pNPB y pNPO son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 2 (L), 3 (D), 4 (D, L), 5 (H, Y), 8 (M), 18 (K), 24 (A, T), 26 (K), 27 (A, I, Q, T), 29 (R), 40 (M), 75 (M), 108 (K, Y), 111 (L, T), 122 (Y), 123 (Q), 125 (Q), 130 (F, H), 134 (L), 137 (H, K, S, T, W, Y), 155 (G), 156 (W), 162 (G), 163 (Y), 176 (I), 180 (K), 187 (H, S, T, W), 232 (P), 233 (D), 265 (M) y 269 (M), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0068] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices

de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la hidrólisis de pNPO y pNPP son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 3 (D,T), 4 (A,D,L,M), 5 (H,Y), 23 (F), 27 (E,N,Q,T), 29 (R), 33 (D,Q), 40 (M), 48 (Q), 51 (I,L,T), 56 (H,K,R,T), 58 (M,Q), 75 (R), 77 (I,T), 87 (P), 108 (K), 111 (A,L), 114 (M), 115 (R), 127 (E,F), 130 (A), 132 (Q,R), 134 (L), 137 (E,G,H,I,K,Q,R,S,Y), 155 (S), 162 (G), 163 (F,P,S,W,Y), 187 (H,N,Q,S,W), 189 (R), 225 (E), 227 (M), 232 (P), 233 (Q) y 264 (R,T), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0069] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la hidrólisis de pNPB, pNPO y pNPP son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 3 (D), 4 (D,L), 5 (H), 5 (Y), 27 (Q,T), 29 (R), 40 (M), 108 (K), 111 (L), 134 (L), 137 (H,K,S,Y), 162 (G), 163 (Y), 187 (H,S,W) y 232 (P), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0070] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8, los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la hidrólisis de pNPB son inferiores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la hidrólisis de pNPP son superiores o iguales a 1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en (Q), 9 (M), 12 (F), 15 (S), 23 (F), 27 (E), 32 (Q), 35 (E), 48 (Q), 58 (M, Q), 71 (E), 75 (R), 115 (R), 130 (A), 132 (Q, R), 137 (E, I, Q, R), 143 (A), 155 (S), 163 (F, P, S), 164 (D), 165 (I, Y), 187 (Q), 225 (E), 227 (A, M), 233 (Q), 252 (A, K,R), 264 (H, R, T) y 269 (V), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

[0071] Las posiciones de enzimas lipolíticas que tienen una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación es una modificación en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión y la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8, y donde los índices de rendimiento (IR) mínimo relativos a la TLL original para la hidrólisis de pNPO son mayores o iguales a 1,1, y donde la modificación productiva se selecciona del grupo que consiste en 1 (Q,S), 2 (L), 3 (T), 4 (A, D, L, M), 5 (H, Y), 9 (K), 11 (K), 12 (F), 15 (S), 24 (A, D, E, H, N), 27 (A, E, Q, T), 29 (R), 32 (A), 33 (D, F, Q), 38 (D), 40 (M), 48 (Q), 49 (V), 51 (I, L, M, T), 56 (H, K, T), 58 (M, Q), 69 (A), 75 (R), 77 (T), 91 (Q), 94 (R), 98 (I), 105 (A), 108 (K, Y), 111 (A, L), 114 (I, M, V), 121 (K), 123 (E, L, M, N, Q), 125 (Q), 127 (E, F), 130 (A, H), 132 (R), 134 (L), 137 (E, G, H, I, K, Q, R, S, V, Y), 143 (A), 151 (P), 154 (F, I, L), 155 (S), 156 (W), 158 (Y), 162 (G), 163 (F, P, W, Y), 164 (D, R), 165 (I, Y), 180 (K), 187 (H, N, Q, S, T, W), 189 (R), 227 (M), 228 (R), 232 (P), 252 (L), 263 (I, V), 265 (M) y 269 (M), donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO: 4.

Polipéptidos de la invención

[0072] La presente invención proporciona polipéptidos novedosos, a los que se puede hacer referencia de forma colectiva como "polipéptidos de la invención". Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos de variantes de enzimas lipolíticas aislados, recombinantes, sustancialmente puros o no naturales, entre los que se incluyen, por ejemplo, polipéptidos de variantes de enzimas lipolíticas que tienen actividad enzimática (p. ej., actividad lipolítica). En algunos modos de realización, los polipéptidos de la invención son útiles en aplicaciones de limpieza y pueden incorporarse en composiciones de limpieza que son útiles en métodos para limpiar un artículo o una superficie (p. ej., de superficie de un artículo) que necesite limpiarse.

[0073] La variante de enzima lipolítica es una variante de una enzima lipolítica original del género *Thermomyces*. Se han encontrado varias enzimas lipolíticas en el género *Thermomyces* que tienen una alta identidad entre sí y con la enzima lipolítica de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), como se muestra en SEQ ID NO: 4. Todas las variantes de enzimas lipolíticas descritas en la sección anterior pueden ser una variante de una enzima lipolítica original del género *Thermomyces* y, más específicamente, una variante de la enzima lipolítica de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) como se muestra en SEQ ID NO: 4.

[0074] La variante de enzima lipolítica tiene una identidad del 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % con respecto a la enzima lipolítica de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), como se muestra en SEQ ID NO: 4.

[0075] Se describen composiciones y métodos relacionados con la lipasa clonada a partir de *Thermomyces lanuginosus* (TLL). Las composiciones y los métodos se basan, en parte, en la observación de que la TLL clonada y expresada tiene actividad de hidrolasa de éster carboxílico (actúa en los ésteres de ácido carboxílico) en presencia de una composición detergente. Estas características de la TLL la hacen muy adecuada para su uso en una variedad de aplicaciones de limpieza, donde la enzima puede hidrolizar lípidos en presencia de tensioactivos y otros componentes que se encuentran en las composiciones detergentes.

[0076] Mientras que la TLL muestra actividad contra una variedad de sustratos naturales y sintéticos, la enzima mostró preferencia por los sustratos C4-C16, con una actividad máxima contra los sustratos C8. Este perfil de especificidad hace que la TLL sea muy adecuada para la hidrólisis de triglicéridos de cadena corta, media y larga y para llevar a cabo reacciones de transesterificación que implican ésteres de ácidos grasos de cadena corta, media y larga. Tal y como se describe en la presente memoria, el polipéptido de TLL original se aisló de *Thermomyces lanuginosus* (de la familia abH23.01, tipo lipasa *Rhizomucor mihei* [Lipase Engineering Database, www.led.uni-stuttgart.de] con la secuencia de aminoácidos de la lipasa madura establecida en PDB: 1DT3). El polipéptido de TLL maduro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En la naturaleza, pueden aparecer polipéptidos de TLL similares, sustancialmente idénticos, por ejemplo, en otras cepas o aislados de *T. lanuginosus*.

[0077] En el presente documento, se describen variantes de enzima lipolítica aisladas, recombinantes, sustancialmente puras o no naturales que tienen actividad lipolítica, cuyo polipéptido comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o al menos aproximadamente un 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a una enzima lipolítica original, como se proporciona en el presente documento.

[0078] La variante de polipéptido puede ser una variante que tiene un grado específico de homología de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de TLL ejemplificado, por ejemplo, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o incluso al menos un 99 % de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. La homología se puede determinar mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos; p. ej., utilizando un programa como BLAST, ALIGN o CLUSTAL, como se ha descrito en el presente documento.

[0079] También se proporciona una secuencia aislada, recombinante, sustancialmente pura o no natural que codifica una variante de enzima lipolítica que tiene actividad lipolítica, comprendiendo dicha variante de enzima lipolítica (por ejemplo, variante de lipasa) una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en no más de 25, no más de 20, no más de 19, no más de 18, no más de 17, no más de 16, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 residuo(s) de aminoácido, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas de acuerdo con la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL mostrada en SEQ ID NO:4 según lo determinado por la alineación de la secuencia de aminoácidos de la variante de enzima lipolítica con la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL.

[0080] Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos de variante de enzima lipolítica de la invención presentan actividades enzimáticas (p. ej., actividades lipolíticas) y, por lo tanto, resultan útiles en aplicaciones de limpieza, incluidos, entre otros, métodos para limpiar artículos de vajilla, artículos de mesa, tejidos y artículos que poseen superficies duras (p. ej., la superficie dura de una mesa, tablero, pared, mueble, suelo, techo, etc.). Algunos ejemplos de composiciones de limpieza que comprenden uno o más polipéptidos de variante de enzima lipolítica se describen a continuación. La actividad enzimática (p. ej., la actividad enzimática lipolítica) de un polipéptido de variante de enzima lipolítica de la invención se puede determinar fácilmente utilizando procedimientos ampliamente conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos presentados a continuación describen métodos para analizar la actividad enzimática, el rendimiento de limpieza, la estabilidad del detergente y/o la termoestabilidad. El rendimiento de las variantes de enzimas lipolíticas de la invención para eliminar manchas (p. ej., una mancha lipídica), limpiar superficies duras o lavar artículos de la colada, de vajilla o de mesa puede determinarse fácilmente utilizando procedimientos ampliamente conocidos en la técnica y/o utilizando procedimientos expuestos en los ejemplos.

[0081] Un polipéptido puede someterse a varios cambios, como una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos, ya sean conservativas o no conservativas, incluso cuando dichos cambios no modifican de manera considerable la actividad enzimática del polipéptido. De forma similar, un ácido nucleico también puede someterse a varios cambios, como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones, de tal forma que un codón concreto codifica el mismo o aminoácido o uno diferente, lo que da como resultado bien una variación silenciosa (p. ej., una mutación en una secuencia nucleotídica tiene como resultado una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, p. ej., cuando el aminoácido codificado no es alterado por la mutación de ácido nucleico) o una variación no silenciosa, una o más deleciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, una o más adiciones o inserciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, y/o la escisión de o uno o más truncamientos de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Muchos de estos cambios en la secuencia de ácido nucleico pueden no alterar de forma sustancial la actividad enzimática de la variante de enzima lipolítica codificada resultante en comparación con la variante de enzima lipolítica codificada por la secuencia de ácido nucleico original. Un ácido nucleico también puede modificarse para incluir uno o más codones que proporcionan una expresión óptima en un sistema de

expresión (p. ej., sistema de expresión bacteriano), mientras que, si se desea, dicho uno o más codones todavía codifican el/los mismo(s) aminoácido(s).

[0082] En el presente documento, se proporciona un género de polipéptidos que comprende polipéptidos de variante de enzima lipolítica que tienen la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad enzimática lipolítica o actividad de rendimiento de limpieza) que comprenden secuencias que tienen las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento y que también comprenden una o más sustituciones de aminoácidos adicionales, como sustituciones conservativas o no conservativas, donde el polipéptido muestra, mantiene o mantiene de forma aproximada la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad enzimática lipolítica o actividad de lipasa, tal como se refleja en la actividad o en el rendimiento de limpieza de la variante de enzima lipolítica). Las sustituciones de aminoácidos según la invención pueden incluir, entre otras, una o más sustituciones no conservativas de aminoácidos y/o una o más sustituciones conservativas de aminoácidos. Una sustitución de residuo de aminoácido conservativa conlleva normalmente el intercambio de un elemento dentro de una clase funcional de residuos de aminoácidos por un residuo que pertenece a la misma clase funcional (los residuos de aminoácidos idénticos se consideran funcionalmente homólogos o se conservan calculando el porcentaje de homología funcional). Una sustitución de aminoácidos conservativa conlleva normalmente la sustitución de un aminoácido en una secuencia de aminoácidos por un aminoácido funcionalmente similar. Por ejemplo, la alanina, la glicina, la serina y la treonina son funcionalmente similares y, en consecuencia, pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. El ácido aspártico y el ácido glutámico pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La asparagina y la glutamina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La arginina, la lisina y la histidina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La isoleucina, la leucina, la metionina y la valina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La fenilalanina, la tirosina y el triptófano pueden servir como sustituciones conservativas entre sí.

[0083] Pueden concebirse otros grupos de sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden agruparse por estructura química, composición o función similar (p. ej., ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, contenedores de sulfuro). Por ejemplo, un grupo alifático puede comprender: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí incluyen: aromáticos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); contenedores de sulfuro: Metionina (M), Cisteína (C); Básicos: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Ácidos: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); residuos sin carga no polares. Cisteína (C), Metionina (M) y Prolina (P); residuos sin carga hidrofílicos: Serina (S), Treonina (T), Asparagina (N) y Glutamina (Q). Los expertos en la materia conocen agrupaciones adicionales de aminoácidos, y se describen en varios libros de texto estándares. El listado de una secuencia polipeptídica en el presente documento, junto con los anteriores grupos de sustituciones, proporciona una relación expresa de todas las secuencias polipeptídicas sustituidas de forma conservativa.

[0084] Existen más sustituciones conservativas dentro de las clases de residuos de aminoácidos descritas anteriormente, que pueden ser adecuadas de forma alternativa o adicional. Los grupos de conservación para sustituciones más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Por consiguiente, por ejemplo, en algunos modos de realización, la invención proporciona un polipéptido de variante de enzima lipolítica aislado o recombinante (por ejemplo, una variante de lipasa) que presenta actividad lipolítica, comprendiendo dicho polipéptido de variante de enzima lipolítica una secuencia de aminoácidos que presenta al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. No se espera que una sustitución conservativa de un aminoácido por otro en una variante de enzima lipolítica de la invención modifique de forma significativa la actividad enzimática o la actividad de rendimiento de limpieza de la variante de enzima lipolítica. La actividad enzimática o la actividad de rendimiento de limpieza de la enzima lipolítica resultante puede determinarse fácilmente utilizando los ensayos estándar y los ensayos descritos en el presente documento.

[0085] Las variaciones de una secuencia polipeptídica de la invención sustituidas de forma conservativa (p. ej., variantes de enzimas lipolíticas de la invención) incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, a menudo menor de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 7 % o aproximadamente un 6 % de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, o menos de aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 2 % o aproximadamente un 1 % de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, con un aminoácido seleccionado de forma conservativa del mismo grupo de sustitución conservativa.

55 Ácidos nucleicos

[0086] En el presente documento, se proporcionan ácidos nucleicos recombinantes, no naturales o aislados (también denominados en el presente documento "polinucleótidos"), que codifican polipéptidos de la invención. Los ácidos nucleicos, incluidos todos los que se describen a continuación, son útiles en la producción recombinante (p. ej., expresión) de polipéptidos de la invención, normalmente a través de la expresión de un vector de expresión plásmido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de interés o un fragmento del mismo. Como se ha analizado previamente, los polipéptidos incluyen polipéptidos de variante de enzima lipolítica, entre los que se

incluyen polipéptidos de variante de lipasa que tienen actividad enzimática (p. ej., actividad lipolítica) que son útiles en aplicaciones de limpieza y composiciones de limpieza para limpiar un artículo o una superficie (p. ej., la superficie de un artículo) que necesite limpiarse.

5 **[0087]** Se proporciona un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o no natural que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cualquier polipéptido (incluida cualquier proteína de fusión, etc.) de la invención tal como se describe anteriormente en la sección titulada "polipéptidos" y en cualquier otra parte del presente documento. También se proporciona un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o no natural que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una combinación de dos o más de cualquier polipéptido de la invención descrito anteriormente y en cualquier otra parte del presente documento.

10 **[0088]** También se proporciona un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de enzima lipolítica que tiene actividad lipolítica, comprendiendo dicha variante de enzima lipolítica (por ejemplo, variante de lipasa) una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en no más de 25, no más de 20, no más de 19, no más de 18, no más de 17, no más de 16, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 residuo(s) de aminoácido, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas de acuerdo con la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL mostrada en SEQ ID NO:1 según lo determinado por la alineación de la secuencia de aminoácidos de la variante de enzima lipolítica con la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL.

20 **[0089]** La presente exposición proporciona ácidos nucleicos que codifican una variante de lipasa de lipasa de *Thermomyces*, como se ha descrito anteriormente, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *T. lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO:4.

25 **[0090]** Los ácidos nucleicos pueden generarse utilizando cualquier técnica adecuada de síntesis, manipulación y/o aislamiento, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, un polinucleótido puede producirse utilizando técnicas de síntesis de ácido nucleico estándar, como técnicas de síntesis en fase sólida que son ampliamente conocidas por los expertos en la materia. La síntesis de los ácidos nucleicos también puede facilitarse (o conseguirse de forma alternativa) mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin carácter limitativo, la síntesis química que utiliza el método de fosoramidita clásico (véase, p. ej., Beaucage *et al.* Tetrahedron Letters 22:1859-69 (1981)); o el método descrito por Matthes *et al.* (véase, Matthes *et al.*, EMBO J. 3:801-805 (1984), como se suele practicar en métodos sintéticos automatizados. Los ácidos nucleicos también pueden producirse utilizando un sintetizador de ADN automático. Pueden adquirirse ácidos nucleicos personalizados de una variedad de fuentes comerciales, (p. ej., The Midland Certified Reagent Company, the Great American Gene Company, Operon Technologies Inc. y DNA2.0). Otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados se conocen en la técnica (véase, p. ej., Itakura], Ann. Rev. Biochem. 53:323 (1984); e Itakura *et al.*, Science 198:1056 (1984)).

Métodos para elaborar variantes de enzimas lipolíticas modificadas de la invención

40 **[0091]** En la técnica, se conocen diversos métodos que resultan adecuados para generar polinucleótidos modificados que codifican variantes de enzimas lipolíticas de la invención, entre los que se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, la mutagénesis de saturación de sitio, la mutagénesis de barrido, la mutagénesis insercional, la mutagénesis de delección, la mutagénesis aleatoria, la mutagénesis dirigida y la evolución dirigida, así como otros enfoques recombinatorios. Algunos métodos para elaborar polinucleótidos y proteínas modificados (p. ej., variantes de enzimas lipolíticas) incluyen metodologías de barajado de ADN, métodos basados en recombinación de genes no homólogos, como ITCHY (Véase, Ostermeier *et al.*, 7:2139-44 (1999)), SCRACHY (véase, Lutz *et al.* 98:11248-53 (2001)), SHIPREC (véase, Sieber *et al.*, 19:456-60 (2001)), y NRR (véase, Bittker *et al.*, 20:1024-9 (2001); Bittker *et al.*, 101:7011-6 (2004)), y métodos que se fundamentan en el uso de oligonucleótidos para insertar delecciones, inserciones y/o mutaciones aleatorias y dirigidas (véase, Ness *et al.*, 20:1251-5 (2002); Coco *et al.*, 20:1246-50 (2002); Zha *et al.*, 4:34-9 (2003); Glaser *et al.*, 149:3903-13 (1992)).

50 Vectores, células y métodos para producir variantes de enzimas lipolíticas de la invención

[0092] Se proporcionan vectores aislados o recombinantes que comprenden al menos un polinucleótido descrito en el presente documento (p. ej., un polinucleótido que codifica una variante de enzima lipolítica de la invención como se define en las reivindicaciones, vectores de expresión aislados o recombinantes o casetes de expresión que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido, constructos de ADN aislados, sustancialmente puros o recombinantes que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido, células aisladas o recombinantes que comprenden al menos un polinucleótido, cultivos celulares que comprenden células que comprenden al menos un polinucleótido, cultivos celulares que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido y composiciones que comprenden uno o más de dichos vectores, ácidos nucleicos, vectores de expresión, casetes de expresión, constructos de ADN, células, cultivos celulares o cualquier combinación o mezcla de los mismos.

[0093] Se proporcionan células recombinantes que comprenden al menos un vector (p. ej., vector de expresión o constructo de ADN) que comprende al menos un ácido nucleico o polinucleótido. Algunas de dichas células recombinantes se transforman o se transfectan con dicho al menos un vector. Dichas células se denominan normalmente células huésped. Algunas de dichas células comprenden células bacterianas, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, las células de *Bacillus sp.*, como, p. ej., las células de *B. subtilis*. Asimismo, se proporcionan células recombinantes (p. ej., células huésped recombinantes) que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica de la invención.

[0094] Además, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico o polinucleótido. El vector puede ser un vector de expresión o casete de expresión en el que una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de enzima lipolítica de la invención está operativamente unida a uno o más segmentos de ácido nucleico necesarios para la expresión génica eficaz (p. ej., un promotor operativamente unido al polinucleótido que codifica una variante de enzima lipolítica de la invención). Un vector puede incluir un terminador de la transcripción y/o un gen de selección, como un gen de resistencia a los antibióticos que permite el mantenimiento continuo en el cultivo de células huésped infectadas con plásmidos mediante el cultivo en medios antimicrobianos.

[0095] Un vector de expresión puede derivarse de ADN plasmídico o viral o, alternativamente, contiene elementos de ambos. Entre los ejemplos de vectores se incluyen, entre otros, pXX, pC194, pJH101, pE194, pHP13 (véase, Harwood y Cutting [eds.], Capítulo 3, Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons ; entre los plásmidos de replicación adecuados para *B. subtilis* se incluyen los de la p. 92; véase también, Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*, en Sonenshein *et al.*, [eds.] *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 615-624).

[0096] Para la expresión y la producción de una proteína de interés (p. ej., la variante de enzima lipolítica) en una célula, al menos un vector de expresión que comprende al menos una copia de un polinucleótido que codifica la enzima lipolítica modificada y que, preferiblemente, comprende múltiples copias, se transforma en la célula en condiciones adecuadas para la expresión de la enzima lipolítica. Una secuencia polinucleotídica que codifica la variante de enzima lipolítica (así como otras secuencias incluidas en el vector) puede integrarse en el genoma de la célula huésped, o un vector plasmídico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la variante de enzima lipolítica puede permanecer como un elemento extracromosómico autónomo dentro de la célula. En la presente memoria, se proporcionan tanto elementos de ácido nucleico extracromosómico como secuencias nucleotídicas entrantes que están integradas en el genoma de la célula huésped. Los vectores descritos en el presente documento son útiles para la producción de las variantes de enzimas lipolíticas de la invención. Un constructo polinucleotídico que codifica la variante de enzima lipolítica puede estar presente en un vector de integración que permite la integración y, opcionalmente, la amplificación del polinucleótido que codifica la variante de enzima lipolítica en el cromosoma bacteriano. Los expertos en la materia conocen ampliamente ejemplos de sitios de integración. La transcripción de un polinucleótido que codifica una variante de enzima lipolítica de la invención es efectuada por un promotor que es el promotor de tipo salvaje para la enzima lipolítica precursora seleccionada. En algunos otros casos, el promotor es heterólogo a la enzima lipolítica precursora, pero funcional en la célula huésped. Concretamente, entre los ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped bacterianas se incluyen, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, los promotores amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHpall, el promotor del gen de amilasa maltogénica de *B. stearrowthermophilus*, el gen de amilasa (BAN) de *B. amyloliquefaciens*, el gen de enzima lipolítica alcalina de *B. subtilis*, el gen de enzima lipolítica alcalina de *B. clausii*, el gen de xilosidasa de *B. pumilis*, el cryIIIA de *B. thuringiensis* y el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*. Entre los promotores adicionales se incluyen, sin carácter limitativo, el promotor A4, así como los promotores P_R o P_L de fago lambda, y los promotores lac, trp o tac de *E. coli*.

[0097] Las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones se pueden producir en células huésped de cualquier microorganismo grampositivo adecuado, incluidos bacterias y hongos. Por ejemplo, en algunos casos, la variante de enzima lipolítica se produce en células huésped de origen fúngico y/o bacteriano. En algunos casos, las células huésped son *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Escherichia sp.* o *Aspergillus sp.* En algunos casos, las variantes de enzimas lipolíticas son producidas por células huésped de *Bacillus sp.* Entre los ejemplos de células huésped de *Bacillus sp.* que son de utilidad en la producción de las variantes de enzimas lipolíticas de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *T. lanuginosus*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearrowthermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. pumilis*, *B. thuringiensis*, *B. clausii* y *B. megaterium*, así como otros organismos del género *Bacillus*. En algunos casos, las células huésped de *B. subtilis* son útiles para la producción de variantes de enzimas lipolíticas. Las patentes estadounidenses n.º 5,264,366 y 4,760,025 (RE 34,606) describen varias cepas huésped de *Bacillus* que pueden utilizarse para producir variantes de enzimas lipolíticas de la invención, aunque pueden utilizarse otras cepas adecuadas.

[0098] Varias cepas bacterianas industriales que pueden utilizarse para producir variantes de enzimas lipolíticas de la invención incluyen cepas de *Bacillus sp.* no recombinantes (esto es, de tipo salvaje), así como variantes de cepas naturales y/o cepas recombinantes. En algunos casos, la cepa huésped es una cepa recombinante, donde un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés se ha introducido en el huésped. En algunos casos, la cepa huésped es una cepa huésped de *B. subtilis* y, en particular, una cepa huésped de *Bacillus subtilis* recombinante.

Se conocen numerosas cepas de *B. subtilis*, entre las que se incluyen, entre otras, p. ej., 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 hasta PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110 y la cepa PEP 211 (véase, p. ej., Hoch *et al.*, *Genetics* 73:215-228 ; véanse también las patentes estadounidenses n.º 4,450,235 y 4,302,544 y la EP 0134048).

5 El uso de *B. subtilis* como células huésped de expresión es ampliamente conocido en la técnica (véase, p. ej., Palva *et al.*, *Gene* 19:81-87 ; Fahnestock y Fischer, *J. Bacteriol.*, 165:796-804; y Wang *et al.*, *Gene* 69:39-47 [1988]).

[0099] En algunos casos, la célula huésped de *Bacillus* es un *Bacillus sp.* que incluye una mutación o delección en al menos uno de los siguientes genes: *degU*, *degS*, *degR* y *degQ*. Preferiblemente, la mutación se produce en un gen *degU* y, más preferiblemente, la mutación es *degU(Hy)32* (véase, p. ej., Msadek *et al.*, *J. Bacteriol.* 172:824-834; y Olmos *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 253:562-567 [1997]). Una cepa huésped adecuada es una *Bacillus subtilis* que porta una mutación *degU32(Hy)*. En algunos casos, el huésped de *Bacillus* comprende una mutación o delección en *scoC4* (véase, p. ej., Caldwell *et al.*, *J. Bacteriol.* 183:7329-7340 [2001]); *spolIE* (véase, p. ej., Arigoni *et al.*, *Mol. Microbiol.* 31:1407-1415 [1999]); y/u *oppA* u otros genes del operón *opp* (véase, p. ej., Perego *et al.*, *Mol. Microbiol.* 5:173-185 [1991]). De hecho, se contempla que cualquier mutación en el operón *opp* que produzca el mismo fenotipo que una mutación en el gen *oppA* se utilizará en algunos casos de la cepa de *Bacillus* alterada. En algunos casos, estas mutaciones se producen de forma independiente, mientras que, en otros casos, se dan combinaciones de mutaciones. En algunos casos, una cepa de células huésped de *Bacillus* alterada que puede utilizarse para producir una variante de enzima lipolítica de la invención es una cepa huésped de *Bacillus* que ya incluye una mutación en uno o más de los genes mencionados anteriormente. Además, son de utilidad las células huésped de *Bacillus sp.* que comprenden mutaciones y/o delecciones de genes de enzima lipolítica endógenos. En algunos casos, la célula huésped de *Bacillus* comprende una delección de los genes *aprE* y *nprE*. En otros casos, la célula huésped de *Bacillus sp.* comprende una delección de 5 genes de enzima lipolítica, mientras que, en otros casos, la célula huésped de *Bacillus sp.* comprende una delección de 9 genes de enzima lipolítica (véase, p. ej., la solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0202535).

[0100] Las células huésped se transforman con al menos un ácido nucleico que codifica al menos una variante de enzima lipolítica de la invención utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tanto si el ácido nucleico se incorpora en un vector como si se utiliza sin la presencia de ADN plasmídico, este se introduce normalmente en un microorganismo, en algunos casos, preferiblemente, una célula de *E. coli* o una célula de *Bacillus* competente. Los métodos para introducir un ácido nucleico (p. ej., ADN) en células de *Bacillus* o células de *E. coli* utilizando vectores o constructos de ADN plasmídico y transformando dichos vectores o constructos de ADN plasmídico en dichas células son ampliamente conocidos. En algunos casos, los plásmidos se aíslan posteriormente de células de *E. coli* y se transforman en células de *Bacillus*. No obstante, no es esencial utilizar microorganismos de intervención como *E. coli* y, en algunos casos, un vector o constructo de ADN se introduce directamente en un huésped de *Bacillus*.

[0101] Los expertos en la materia están bien informados de métodos adecuados para introducir secuencias de ácidos nucleicos o polinucleotídicas en células de *Bacillus* (véase, p. ej., Ferrari *et al.*, "Genetics," en Harwood *et al.* [eds.], *Bacillus*, Plenum Publishing Corp., pp. 57-72; Saunders *et al.*, *J. Bacteriol.* 157:718-726 [1984]; Hoch *et al.*, *J. Bacteriol.* 93:1925-1937 [1967]; Mann *et al.*, *Current Microbiol.* 13:131-135 [1986]; Holubova, *Folia Microbiol.* 30:97 [1985]; Chang *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 168:11-115 [1979]; Vorobjeva *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 7:261-263 [1980]; Smith *et al.*, *Appl. Env. Microbiol.* 51:634 [1986]; Fisher *et al.*, *Arch. Microbiol.* 139:213-217 [1981]; y McDonald, *J. Gen. Microbiol.* 130:203 [1984]). De hecho, dichos métodos como la transformación, incluyendo la transformación y la congregación de protoplastos, la transducción y la fusión de protoplastos, son ampliamente conocidos y adecuados para su utilización en la presente exposición. Se utilizan métodos de transformación para introducir un vector o constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de enzima lipolítica de la presente invención en una célula huésped. Los métodos conocidos en la técnica para transformar células de *Bacillus* incluyen métodos como la transformación de recuperación de un marcador plasmídico, que conlleva la absorción de un plásmido donante por parte de células competentes que portan un plásmido residente parcialmente homólogo (véase, Contente *et al.*, *Plasmid* 2:555-571 [1979]; Haima *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 223:185-191 [1990]; Weinrauch *et al.*, *J. Bacteriol.* 154:1077-1087 [1983]; y Weinrauch *et al.*, *J. Bacteriol.* 169:1205-1211 [1987]). En este método, el plásmido donante entrante se recombina con la región homóloga del plásmido "auxiliar" residente en un proceso que imita la transformación cromosómica.

[0102] Además de los métodos utilizados comúnmente, en algunos casos, las células huésped se transforman directamente con un vector o constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de enzima lipolítica de la invención (esto es, no se utiliza una célula intermedia para amplificar o procesar de cualquier otra forma el vector o constructo de ADN antes de su introducción en la célula huésped). La introducción del vector o constructo de ADN en la célula huésped incluye los métodos físicos y químicos conocidos en la técnica para introducir una secuencia de ácido nucleico (p. ej., una secuencia de ADN) en una célula huésped sin inserción en un plásmido o vector. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, precipitación con cloruro de calcio, electroporación, ADN desnudo, liposomas y similares. En casos adicionales, el vector o los constructos de ADN se cotransforman con un plásmido sin insertarse en el plásmido. En otros casos, se deleciona un marcador selectivo de la cepa de *Bacillus* modificada utilizando métodos conocidos en la técnica (véase Stahl *et al.*, *J. Bacteriol.* 158:411-418 [1984]; y Palmeros *et al.*, *Gene* 247:255-264 [2000]).

[0103] En algunos casos, las células transformadas se cultivan en medios nutritivos convencionales. Las condiciones de cultivo específicas adecuadas, como la temperatura, el pH y similares son conocidas por los expertos en la materia y se describen con detalle en la literatura científica. También se proporciona un cultivo (p. ej., un cultivo celular) que comprende al menos una variante de enzima lipolítica o al menos un ácido nucleico.
5 También se proporcionan composiciones que comprenden al menos un ácido nucleico, vector o constructo de ADN.

[0104] En algunos casos, las células huésped transformadas con al menos una secuencia polinucleotídica que codifica al menos una variante de enzima lipolítica de la invención se cultivan en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de la enzima lipolítica presente, tras lo cual se recupera la enzima lipolítica resultante del cultivo. El medio utilizado para cultivar las células comprende cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de las células huésped, como medios complejos o mínimos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados pueden adquirirse gracias a proveedores comerciales, o se pueden preparar conforme a recetas publicadas (véanse p. ej., los catálogos de la American Type Culture Collection). En algunos casos, la enzima lipolítica producida por las células se recupera del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales, incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, la separación de las células huésped del medio mediante centrifugación o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado por medio de una sal (p. ej., sulfato de amonio), purificación cromatográfica (p. ej., intercambio de iones, filtración en gel, afinidad, etc.). En la presente exposición, puede utilizarse cualquier método adecuado para recuperar o purificar una variante de enzima lipolítica.
10
15

[0105] En algunos casos, una variante de enzima lipolítica producida por una célula huésped recombinante se secreta en el medio de cultivo. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación puede utilizarse para facilitar la purificación de proteínas solubles. Un vector o constructo de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de enzima lipolítica puede comprender también una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación para facilitar la purificación de la variante de enzima lipolítica (véase, p. ej., Kroll *et al.*, DNA Cell Biol. 12:441-53 [1993]). Dichos dominios que facilitan la purificación incluyen, sin carácter limitativo, por ejemplo, péptidos quelantes de metal como módulos histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados (véase, Porath, Protein Expr. Purif. 3:263-281 [1992]), dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por afinidad/extensión FLAGS (por ejemplo, dominios de proteína A disponibles de Immunex Corp., Seattle, Washington). La inclusión de una secuencia de enlace escindible como un Factor XA o enteroquinasa (por ejemplo, secuencias disponibles de Invitrogen, San Diego, California) entre el dominio de purificación y la proteína heteróloga también resultan de utilidad para facilitar la purificación.
20
25
30

[0106] Son ampliamente conocidos los ensayos para detectar y medir la actividad enzimática de una enzima, como una variante de enzima lipolítica de la invención. También son conocidos por los expertos en la materia varios ensayos para detectar y medir la actividad de las enzimas lipolíticas (p. ej., las variantes de enzimas lipolíticas de la invención). Puede utilizarse una variedad de métodos para determinar el nivel de producción de una enzima lipolítica madura (p. ej., la variante de enzimas lipolíticas madura de la presente invención) en una célula huésped. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., métodos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la enzima lipolítica. Entre los métodos de ejemplo se incluyen, pero sin carácter limitativo, los ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), los radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés), los inmunoensayos fluorescentes (FIA, por sus siglas en inglés) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Estos y otros ensayos son ampliamente conocidos en la técnica (véase, p. ej., Maddox *et al.*, J. Exp. Med. 158:1211 [1983]).
35
40

[0107] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para elaborar o producir una variante de enzima lipolítica madura de la invención, tal como se define en las reivindicaciones.
45

[0108] Una variante de enzima lipolítica madura no incluye un péptido señal o una secuencia propeptídica. Algunos métodos comprenden la elaboración o producción de una variante de enzima lipolítica de la invención en una célula huésped bacteriana recombinante, como, por ejemplo, una célula de *Bacillus sp.* (por ejemplo, una célula de *B. subtilis*). Por ejemplo, en el presente documento se proporciona un método para producir una variante de enzima lipolítica de la invención, comprendiendo el método el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de enzima lipolítica de la invención en condiciones propicias para la producción de la variante de enzima lipolítica. Algunos de dichos métodos comprenden además la recuperación de la variante de enzima lipolítica del cultivo.
50

[0109] Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan métodos de producción de una variante de enzima lipolítica de la invención, comprendiendo los métodos: (a) introducir un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de enzima lipolítica de la invención en una población celular (p. ej., células bacterianas, como células de *B. subtilis*); y (b) cultivar las células en un medio de cultivo en condiciones propicias para producir la variante de enzima lipolítica codificada por el vector de expresión. Algunos de dichos métodos comprenden también: (c) aislar la variante de enzima lipolítica de las células o del medio de cultivo.
55
60

[0110] En algunos modos de realización, las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones pueden utilizarse en composiciones que comprenden un material auxiliar y una variante de enzima lipolítica, donde la composición es un producto de cuidado del hogar y de tejidos. En el ejemplo 1, se describen ejemplos de composiciones adecuadas.

5 **[0111]** En algunos modos de realización, las composiciones de productos para el cuidado del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica comprenden uno o más de los siguientes ingredientes (basados en el peso total de la composición): desde aproximadamente un 0,0005 % en peso hasta aproximadamente un 0,5 % en peso, desde aproximadamente un 0,001 % en peso hasta aproximadamente un 0,1 % en peso o incluso desde aproximadamente un 0,002 % en peso hasta aproximadamente un 0,05 % en peso de dicha variante de enzima lipolítica; y uno o más de los siguientes: desde aproximadamente un 0,00003 % en peso hasta aproximadamente un 0,1 % en peso de agente de matizado de tejidos; desde aproximadamente un 0,001 % en peso hasta aproximadamente un 5 % en peso de cápsulas de perfume; desde aproximadamente un 0,001 % en peso hasta aproximadamente un 1 % en peso de blanqueadores solubles en agua fría; desde aproximadamente un 0,00003 % en peso hasta aproximadamente un 0,1 % en peso de catalizadores de blanqueo; desde aproximadamente un 0,00003 % en peso hasta aproximadamente un 0,1 % en peso de células limpiadoras bacterianas; y/o desde aproximadamente un 0,05 % en peso hasta aproximadamente un 20 % en peso de tensioactivos no iónicos de Guerbet.

20 **[0112]** Tal y como se utiliza en el presente documento, el “rendimiento de lavado” de una enzima lipolítica (p. ej., una variante de enzima lipolítica de la invención) se refiere a la contribución de la enzima lipolítica al lavado que proporciona un rendimiento de limpieza adicional al detergente en comparación con el detergente sin la adición de la variante de enzima lipolítica a la composición. El rendimiento de lavado se compara en condiciones de lavado pertinentes. En algunos sistemas de prueba, otros factores pertinentes, como la composición detergente, la concentración de espuma, la dureza del agua, el mecanismo de lavado, el tiempo, el pH y/o la temperatura pueden controlarse de tal forma que se imite(n) la(s) condición(es) típica(s) para la aplicación doméstica en un determinado segmento de mercado (p. ej., lavado de la vajilla de forma manual o a mano, lavado de la vajilla de forma automática, limpieza de artículos de vajilla, limpieza de artículos de mesa, limpieza de tejidos, etc.).

[0113] En algunos modos de realización, la composición de producto para el cuidado del hogar y de tejidos es un detergente para lavado de ropa granulado o en polvo.

30 **[0114]** En algunos modos de realización, la composición de producto para el cuidado del hogar y de tejidos es un detergente para lavado de ropa líquido o un detergente para lavar la vajilla.

35 **[0115]** Se pretende que el producto para el cuidado del hogar y de tejidos se proporcione en cualquier forma adecuada, incluyendo un fluido o un sólido. El producto para el cuidado del hogar y de tejidos puede presentarse en forma de bolsa de dosis unitaria, especialmente cuando se encuentra en forma de líquido, y normalmente el producto para el cuidado del hogar y de tejidos está al menos parcialmente, o incluso completamente, contenido en una bolsa soluble en agua. Además, en algunos modos de realización de los productos para el cuidado del hogar y de tejidos que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica, el producto para el cuidado del hogar y de tejidos puede tener cualquier combinación de parámetros y/o características detalladas anteriormente.

Composiciones de limpieza

40 **[0116]** Las composiciones de limpieza y las formulaciones de limpieza incluyen cualquier composición adecuada para limpiar, blanquear, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto, artículo y/o superficie. Dichas composiciones y formulaciones incluyen, sin carácter limitativo, por ejemplo, composiciones líquidas y/o sólidas, incluyendo composiciones de limpieza o detergentes (p. ej., composiciones detergentes para tejidos delicados y composiciones detergentes o de limpieza para ropa líquidas, en pastillas, en gel, en barra, granuladas y/o sólidas; composiciones y formulaciones de limpieza para superficies duras, como para encimeras y ventanas de vidrio, madera, cerámica y metal; limpiadores de alfombras, limpiadores para hornos, ambientadores para tejidos, suavizantes para tejidos, y composiciones detergentes o de limpieza potenciadoras para lavado de ropa y artículos textiles, composiciones de limpieza aditivas para lavado de ropa, y composiciones de limpieza de pretratado para lavado de ropa; composiciones lavavajillas, incluyendo composiciones para el lavado de vajilla de forma manual o a mano (p. ej., detergentes para el lavado de vajilla de forma “manual” o “a mano”) y composiciones para el lavado de vajilla de forma automática (p. ej., “detergentes para el lavado de vajilla de forma automática”).

55 **[0117]** La composición de limpieza o las formulaciones de limpieza incluyen, tal como se utilizan en el presente documento y a menos que se indique otra cosa, agentes de lavado de uso intensivo o multiusos en polvo o granulados, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en forma líquida, granulada, en gel, sólida, en pastillas o en pasta, en concreto los tipos denominados detergentes líquidos de uso intensivo (HDL, por sus siglas en inglés) o detergentes en polvo de uso intensivo (HDD, por sus siglas en inglés); detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado de la vajilla de forma manual o a mano, incluyendo los de tipo muy espumoso; agentes de lavavajillas a mano o manuales, de lavavajillas automáticos o para el lavado de artículos de vajilla o artículos de mesa, incluidos los varios tipos en pastillas, en polvo, sólidos, granulados, líquidos, en gel o de enjuague para uso doméstico o institucional; agentes desinfectantes y de limpieza líquidos, incluidos los tipos para el lavado de manos antibacteriano, barras de limpieza, enjuagues bucales, productos para la limpieza

de dentadura, champús para automóviles, champús para alfombras, limpiadores para el baño, champús para el pelo y/o enjuagues de pelo para humanos y otros animales; geles de ducha y baños de espuma y limpiadores de metales; así como productos auxiliares de limpieza, como aditivos blanqueadores y productos de tipo "antiadherencia de manchas" o de pretratamiento. En algunos modos de realización, las composiciones granuladas se encuentran en forma "compacta"; en algunos modos de realización, las composiciones líquidas se encuentran en forma "concentrada".

[0118] Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "composición detergente" o "formulación detergente" se emplea en referencia a una composición prevista para su utilización en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios o manchados, incluidos artículos u objetos de tejido o sin tejido concretos. Dichas composiciones de la presente invención no se limitan a ninguna composición o formulación detergente en concreto. De hecho, en algunos modos de realización, los detergentes de la invención comprenden al menos una variante de enzima lipolítica de la invención y, además, uno o más tensioactivos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, óxidorreductasas, mejoradores (por ejemplo, una sal mejoradora), agentes de blanqueo, activadores de blanqueo, agentes blanqueadores, colorantes fluorescentes, inhibidores de aglomerantes, agentes secuestrantes, activadores de enzimas, antioxidantes y/o solubilizantes. En algunos casos, una sal mejoradora es una mezcla de una sal de silicato y una sal de fosfato, preferiblemente, con más silicato (p. ej., metasilicato sódico) que fosfato (p. ej., tripolifosfato sódico). Algunas composiciones de la invención, como, por ejemplo, entre otras, composiciones de limpieza o composiciones detergentes, no contienen ningún fosfato (p. ej., sal de fosfato o mejorador de fosfato).

[0119] A no ser que se indique otra cosa, todos los niveles de componente o de composición que se proporcionan en el presente documento se elaboran en referencia al nivel activo de ese componente o composición, y no incluyen impurezas, como, por ejemplo, subproductos o disolventes residuales, que pueden estar presentes en fuentes disponibles en el mercado. Los pesos de los componentes enzimáticos se basan en la proteína activa total. Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso salvo que se indique de otro modo. Todos los porcentajes y relaciones se calculan en función de la composición total salvo que se indique de otro modo. En las composiciones detergentes de ejemplo, los niveles enzimáticos se expresan en enzima pura en peso de la composición total y, salvo que se indique de otro modo, los ingredientes de detergente se expresan en peso de las composiciones totales.

[0120] Como se indica en el presente documento, en algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden además materiales auxiliares que incluyen, entre otros, tensioactivos, mejoradores, blanqueadores, activadores de blanqueo, catalizadores de blanqueador, otras enzimas, sistemas estabilizadores de enzimas, quelantes, abrillantadores ópticos, polímeros de liberación de suciedad, agentes de transferencia de tinte, dispersantes, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, colorantes, sales de relleno, hidrotropos, fotoactivadores, fluorescentes, suavizantes de tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes contra el encogimiento, agentes contra la formación de arrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, agentes para el cuidado de la plata, contra la pérdida de lustre y/o contra la corrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, coadyuvantes de elaboración, pigmentos y agentes de control del pH (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 6,610,642, 6,605,458, 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 y 5,646,101). A continuación, se ejemplifican de forma detallada algunos modos de realización de materiales de composición de limpieza específicos. En los modos de realización en los que los materiales auxiliares de limpieza no son compatibles con las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención en las composiciones de limpieza, se utilizan métodos adecuados para mantener separados los materiales de limpieza auxiliares y la(s) enzima(s) lipolítica(s) (es decir, que no están en contacto entre sí) hasta que la combinación de los dos componentes sea adecuada. Dichos métodos de separación incluyen cualquier método adecuado conocido en la técnica (p. ej., cápsulas recubiertas de gelatina, encapsulación, pastillas, separación física, etc.).

Composiciones detergentes que contienen lipasa

[0121] Las composiciones detergentes de la invención pueden, por ejemplo, formularse como composiciones detergentes para lavado a mano o a máquina, incluidas composiciones aditivas para lavado y composiciones adecuadas para su uso en el tratamiento previo de tejidos manchados, composiciones suavizantes de tejido añadidas al aclarado y composiciones para su uso en operaciones de limpieza domésticas de superficies duras generales y operaciones de lavado de vajilla.

[0122] La composición detergente de acuerdo con la invención puede encontrarse en forma líquida, en pasta, en gel, en barras o granulada. El pH (medido en solución acuosa en concentración de uso) será normalmente neutro o alcalino, p. ej., en el rango de 7-11, concretamente 9-11. Las composiciones granuladas de acuerdo con la presente invención pueden también estar en "forma compacta", es decir, pueden tener una densidad relativamente más alta que otros detergentes granulados convencionales, es decir, entre 550 y 950 g/l.

[0123] Las presentes composiciones pueden incluir uno o más adyuvantes (por ejemplo, tensioactivos eficaces para eliminar ácidos grasos del tejido) y una o más enzimas lipolíticas. En algunos modos de realización, el adyuvante y la enzima lipolítica están presentes en una única composición. En otros modos de realización, el adyuvante y la enzima lipolítica están presentes en composiciones independientes que se combinan antes de entrar en contacto con una mancha de grasa en un tejido, o que se combinan sobre la mancha de grasa.

[0124] Las presentes composiciones de limpieza pueden incluir uno o más adyuvantes (tensoactivos) para su uso en combinación con una enzima lipolítica. Los adyuvantes adecuados pueden tener una porción hidrófila relativamente pequeña sin carga neta y una porción hidrofóbica lineal o saturada. En algunos modos de realización, la porción hidrofóbica incluye, al menos, seis, siete, ocho o nueve carbonos alifáticos adyacentes. En algunos modos de realización, la porción hidrofóbica es cíclica. En algunos modos de realización, la porción hidrofóbica no se ramifica. Los tensoactivos adecuados incluyen compuestos a base de azúcar y compuestos zwitteriónicos. En la WO2011078949 se dan a conocer adyuvantes adecuados.

[0125] Los tensoactivos a base de azúcar incluyen maltopiranosidos, tiomaltopiranosidos, glucopiranosidos y sus derivados. Los tensoactivos a base de maltosa fueron, por lo general, más eficaces que los tensoactivos a base de glucosa. En algunos modos de realización, un tensoactivo a base de azúcar preferido presenta una longitud de cadena de parte hidrofóbica de al menos 4, al menos 5, al menos 6 e incluso al menos 7 carbonos. La parte puede ser alifática o cíclica. La parte puede ser no ramificada, aunque la ramificación es aceptable con una longitud de cadena suficiente.

[0126] Ejemplos particulares de tensoactivos a base de azúcar incluyen nonil-β-D-maltopiranosido, decil-β-D-maltopiranosido, undecil-β-D-maltopiranosido, dodecil-β-D-maltopiranosido, tridecil-β-D-maltopiranosido, tetradecil-β-D-maltopiranosido, hexaecil-β-D-maltopiranosido, n-dodecil-β-D-maltopiranosido y similares, 2,6-dimetil-4-heptil-β-D-maltopiranosido, 2-propil-1-pentil-β-D-maltopiranosido, nonil-β-D-glucopiranosido, nonil-β-D-glucopiranosido, decil-β-D-glucopiranosido, dodecil-β-D-glucopiranosido, monododecanoato de sacarosa, determinados ciclohexilalquil-β-D-maltósidos (por ejemplo, los CYMAL® y CYGLA) y los tensoactivos MEGA™.

[0127] El adyuvante puede ser un tensoactivo no iónico sin azúcar. Los tensoactivos de ejemplo incluyen tritones con una repetición de etoxilato de nueve o inferior. Algunos tritones específicos son ANAPOE®-X-100 y ANAPOE®-X-114. En algunos modos de realización, el adyuvante es un tensoactivo de óxido de fosfina no iónico, que presenta una parte hidrofóbica de al menos aproximadamente 9 carbonos. Los tensoactivos de ejemplo incluyen óxido de dimetildecilfosfina y óxido de dimetildodecilfosfina.

[0128] El adyuvante puede ser un tensoactivo zwitteriónico, tal como una FOS-colina. En algunos modos de realización, la FOS-colina presenta una parte hidrofóbica con una longitud de cadena de 12 o superior. La parte hidrofóbica puede ser saturada e insaturada y puede ser cíclica. Ejemplos de tensoactivos FOS-colina incluyen FOS-CHOLINE®-12, FOS-CHOLINE®-13, FOS-CHOLINE®-14, LYSO FOS-CHOLINE®-14, FOS-CHOLINE®-15, FOS-CHOLINE®-16, FOS-MEA®-12, DODECAFOS, ISO insat 11-10, ISO 11-6, CYOFO, NOPOL-FOS, CYCLOFOS® (CYMAL®)-5, -6, -7, -8, etc., y similares.

[0129] En algunos casos, el adyuvante puede ser un tensoactivo zwitteriónico de sulfobetaína. Los tensoactivos de sulfobetaína preferidos tienen una parte hidrofóbica que presenta al menos 12 carbonos, p. ej., ANZERGENT® 3-12 y ANZERGENT® 3-14. Los óxidos zwitteriónicos y los tensoactivos a base de CHAPS (p. ej., CHAPS y CHAPSO) también son eficaces, normalmente en dosis más altas que las sulfobetaínas.

[0130] En algunos casos, el adyuvante puede ser un detergente aniónico, por ejemplo, una sarcosina. Las sarcosinas preferidas presentan una parte hidrofóbica que tiene al menos 10 carbonos. En algunos casos, el adyuvante también puede ser un deoxicolato.

[0131] El adyuvante puede estar presente en una composición en una cantidad de al menos un 0,001 %, al menos un 0,005 %, al menos un 0,01 %, al menos un 0,05 %, al menos un 0,1 % o más, o al menos 0,01 ppm, al menos 0,05 ppm, al menos 0,1 ppm, al menos 0,5 ppm, al menos 1 ppm, al menos 5 ppm, al menos 10 ppm o más. En algunos casos, el adyuvante puede presentarse en un rango preseleccionado, p. ej., de aproximadamente 0,001-0,01 %, aproximadamente 0,01-0,1 %, aproximadamente 0,1-1 % o aproximadamente 0,01-1 ppm, aproximadamente 0,1-1 ppm, o aproximadamente 1-10 ppm. En algunos casos, se observa una actividad óptima en un rango, por encima y por debajo del cual se reduce la actividad.

[0132] El sistema tensoactivo del detergente puede comprender tensoactivos no iónicos, aniónicos, catiónicos, anfólicos y/o zwitteriónicos. El tensoactivo está presente normalmente a un nivel de entre un 0,1 % y 60 % en peso, p. ej., 1 % a 40 %, particularmente 10-40 %, preferiblemente desde aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 20 % en peso. El detergente normalmente contendrá un 0-50 % de tensoactivo aniónico, como alquilbencenosulfonato lineal (LAS), alfa-olefina sulfonato (AOS), alquil sulfato (sulfato de alcohol graso) (AS), alcohol etoxisulfato (AEOS o AES), alcanosulfonatos secundarios (SAS), ésteres metílicos de ácidos alfa-sulfo grasos, ácido alquil- o alquenilsuccínico o jabón.

[0133] El detergente puede comprender un 0-40 % de condensados de óxido de polialquileno tensoactivo no iónico (p. ej., óxido de polietileno) de alquilfenoles. Algunos tensoactivos no iónicos preferidos son el etoxilato de alcohol (AEO o AE), los etoxilatos de alcohol carboxilado, el etoxilato de nonilfenol, el alquilpoliglicósido, el óxido de alquil dimetil amina, la monoetanolamida de ácido graso etoxilado, la monoetanolamida de ácido graso, la alquil (N-metil) -glucosaamida o la polihidroxi alquil amida de ácido graso (p. ej., como se describe en WO 92106154).

[0134] Los tensoactivos no iónicos semipolares son otra categoría de tensoactivos no iónicos que incluyen óxidos de amina solubles en agua que contienen una fracción alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y 2 fracciones seleccionadas del grupo que consiste en grupos alquilo y grupos hidroxialquilo

que contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono; óxidos de fosfina solubles en agua que contienen una fracción alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y 2 fracciones seleccionadas del grupo que consiste en grupos alquilo y grupos hidroxialquilo que contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono; y sulfóxidos solubles en agua que contienen una

5 fracción alquilo de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono y una fracción seleccionada del grupo que consiste en fracciones alquilo e hidroxialquilo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono. Los tensioactivos de óxido de amina, en particular, incluyen óxidos de alquil dimetil amina C₁₀-C₁₈ y óxidos de alcoxi etil dihidroxi etil amina C₈-C₁₂.

[0135] La composición detergente puede comprender además tensioactivos catiónicos. Los tensioactivos detergentes catiónicos utilizados son los que tienen un grupo hidrocarbilo de cadena larga. Ejemplos de tales tensioactivos catiónicos incluyen tensioactivos de amonio, tales como halogenuros de alquil trimetil amonio. Los tensioactivos catiónicos muy preferidos son los compuestos de amonio cuaternario solubles en agua. Algunos ejemplos de compuestos de amonio cuaternario adecuados incluyen el cloruro o bromuro de trimetilamonio de coco; cloruro o bromuro de metil dihidroxietilamonio de coco; cloruro de decil trietilamonio; cloruro o bromuro de decil dimetil hidroxietilamonio; cloruro o bromuro de dimetil hidroxietilamonio C₁₂-15; cloruro o bromuro de dimetil hidroxietilamonio de coco; metil sulfato de miristil trimetil amonio; cloruro o bromuro de lauril dimetil bencil amonio; cloruro o bromuro de lauril dimetil (etenoxi)₄ amonio; ésteres de colina, dialquil imidazolin.

[0136] La composición detergente puede comprender además tensioactivos anfólicos. Estos tensioactivos pueden describirse ampliamente como derivados alifáticos de aminas secundarias o terciarias, o derivados alifáticos de aminas secundarias y terciarias heterocíclicas en las que el radical alifático puede ser de cadena lineal o ramificada. Uno de los sustituyentes alifáticos contiene al menos aproximadamente 8 átomos de carbono, típicamente de aproximadamente 8 a aproximadamente 18 átomos de carbono, y al menos uno contiene un grupo aniónico solubilizante en agua, p. ej., carboxi, sulfonato, sulfato. Algunos ejemplos de compuestos que entran dentro de esta definición son el 3-(dodecilamino) propionato de sodio, el 3-(dodecilamino)-propano-1-sulfonato de sodio, el 2-(dodecilamino) etilsulfato de sodio, el 2-(dimetilamino) octadecanoato de sodio, el 3-(N-carboximetildodecilamino) propano-1-sulfonato disódico, el octadecil-iminodiacetato disódico, el 1-carboximetil-2-undecilimidazol de sodio y el N,N-bis(2-hidroxietyl)-2-sulfato-3-dodecoxi-propilamina de sodio. Se prefiere el 3-(dodecilamino)propano-1-sulfonato de sodio.

[0137] Los tensioactivos zwitteriónicos también se utilizan en composiciones detergentes, especialmente en el lavado de ropa. Estos tensioactivos pueden describirse ampliamente como derivados de aminas secundarias y terciarias, derivados de aminas heterocíclicas secundarias y terciarias o derivados de compuestos de amonio cuaternario, fosfonio cuaternario o sulfonio terciario. El átomo catiónico del compuesto cuaternario puede formar parte de un anillo heterocíclico. En todos estos compuestos, hay al menos un grupo alifático, de cadena lineal o ramificada, que contiene de aproximadamente 3 a 18 átomos de carbono y al menos un sustituyente alifático que

35 contiene un grupo aniónico solubilizante en agua, p. ej., carboxi, sulfonato, sulfato, fosfato o fosfonato. Los compuestos zwitteriónicos etoxilados en combinación con tensioactivos zwitteriónicos se han utilizado particularmente para la eliminación de tierra arcillosa en aplicaciones de lavado de ropa.

[0138] El detergente puede contener un 1-65 % de un mejorador de detergente o de un agente complejante como la zeolita, el difosfato, el trifosfato, el fosfonato, el citrato, el ácido nitrilotriacético (NTA), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido dietilentriaminopentaacético (DTMPA), el ácido alquilsuccínico o alquenilsuccínico, los silicatos solubles o los silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst). El detergente también puede ser no mejorado, es decir, estar exento, en lo esencial, de mejorador de detergente.

[0139] Los mejoradores de detergente pueden subdividirse en los que contienen fósforo y en los que no contienen fósforo. Algunos ejemplos de mejoradores de detergente alcalinos inorgánicos que contienen fósforo incluyen las sales solubles en agua, especialmente los pirofosfatos, ortofosfatos, polifosfatos y fosfonatos de metales alcalinos. Algunos ejemplos de mejoradores inorgánicos que no contienen fósforo incluyen los carbonatos, boratos y silicatos de metales alcalinos solubles en agua, así como los disilicatos estratificados y los diversos tipos de aluminosilicatos amorfos o cristalinos insolubles en agua de los cuales las zeolitas son el representante más conocido. Algunos ejemplos de mejoradores orgánicos adecuados incluyen las sales de succinatos, malonatos, malonatos de ácidos grasos, sulfonatos de ácidos grasos, carboximetoxisuccinatos, poliacetatos, carboxilatos, policarboxilatos, aminopolicarboxilatos y poliacetilcarboxilatos de metal alcalino, amonio o amonio sustituido.

[0140] Un quelante adecuado para su inclusión en las composiciones detergentes es el ácido etilendiamina-N, N'-disuccínico (EDDS) o las sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio o amonio sustituido del mismo, o mezclas de los mismos. Los compuestos de EDDS preferidos son la forma de ácido libre y su sal de sodio o magnesio. Ejemplos de dichas sales de sodio preferidas de EDDS incluyen Na₂EDDS y Na₄EDDS. Ejemplos de dichas sales de magnesio preferidas de EDDS incluyen MgEDDS y Mg₂EDDS. Las sales de magnesio son las más preferidas para su inclusión en composiciones.

[0141] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Entre los ejemplos, se incluye la carboximetilcelulosa (CMC), la poli(vinilpirrolidina) (PVP), el polietilenglicol (PEG), el poli(alcohol vinílico) (PVA), los policarboxilatos, como los poli(acrilatos), los copolímeros de ácido maleico/acrílico y los copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

[0142] La composición detergente puede contener agentes blanqueadores de tipo cloro/bromo o de tipo oxígeno. Los agentes blanqueadores pueden ser recubiertos o encapsulados. Algunos ejemplos de blanqueadores de tipo cloro/bromo inorgánicos son el hipoclorito o hipobromito de litio, sodio o calcio, así como el fosfato trisódico clorado. El sistema blanqueador puede comprender también una fuente de peróxido de hidrógeno, como el perborato o percarbonato, que puede combinarse con un activador de blanqueo que forma perácido, como la tetraacetilendiamina (TAED) o el nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS). Algunos ejemplos de blanqueadores orgánicos de tipo cloro/bromo son las N-bromo y N-cloro imidas heterocíclicas, tales como los ácidos tricloroisocianúrico, tribromoisocianúrico, dibromoisocianúrico y dicloroisocianúrico, y sus sales con cationes solubilizantes en agua tales como el potasio y el sodio. Los compuestos de hidantoína también son adecuados. El sistema blanqueador puede comprender también peroxiácidos de, p. ej., tipo amida, imida o sulfona.

[0143] En los detergentes lavavajillas, se prefieren los blanqueadores de oxígeno, por ejemplo, en forma de persal inorgánica, preferiblemente, con un precursor de blanqueador o como un compuesto de peroxiácido. Ejemplos típicos de compuestos blanqueadores peroxi adecuados son los perboratos de metal alcalino, tanto los tetrahidratos como los monohidratos, los percarbonatos, persilicatos y perfosfatos de metal alcalino. Los materiales activadores preferidos son la tetraacetilendiamina (TAED), el nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS), el 3,5-trimetilhexanoloiloxibencenosulfonato (ISONOBS) o la pentaacetilglucosa (PAG).

[0144] La lipasa de la invención u, opcionalmente, otra enzima incorporada en la composición detergente, normalmente se incorpora en la composición de detergente a un nivel de 0,00001 % a un 3 % de proteína enzimática en peso de la composición, preferiblemente, a un nivel de 0,0001 % a 1 % de proteína enzimática en peso de la composición, más preferiblemente, a un nivel de 0,001 % a 0,5 % de proteína enzimática en peso de la composición, incluso más preferiblemente a un nivel de 0,01 % a 0,2 % de proteína enzimática en peso de la composición. La cantidad de proteína lipasa puede ser de 0,001 a 30 mg por gramo de detergente o de 0,001 a 100 mg por litro de solución de lavado. Las variantes de lipasa de la invención son particularmente adecuadas para detergentes que comprenden una combinación de tensioactivo aniónico y no iónico con un 70-100 % en peso de tensioactivo aniónico y un 0-30 % en peso de no iónico, particularmente un 80-100 % de tensioactivo aniónico, y un 0-20 % de tensioactivo no iónico. Como se describe con más detalle, algunas lipasas preferidas de la invención también son adecuadas para detergentes que comprenden un 40-70 % de tensioactivo aniónico y un 30-60 % de tensioactivo no iónico. La composición detergente puede, además de la lipasa de la invención, comprender otras enzimas que proporcionan beneficios de rendimiento de limpieza y/o de cuidado de tejidos; p. ej. proteasas, lipasas adicionales, cutinasas, amilasas, celulasas, peroxidases, oxidasas (por ejemplo, lacasas), mananasas, oxidorreductasas y/o pectato liasas.

[0145] Las enzimas de la composición detergente se pueden estabilizar con agentes estabilizadores convencionales (por ejemplo, un poliol tal como el propilenglicol o glicerol, un azúcar o polialcohol, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico como, por ejemplo, un éster de borato aromático). Algunos derivados de ácido borónico o de ácido borínico como estabilizadores enzimáticos incluyen ácido bórico, ácido tiofeno-3-borónico, ácido tiofeno-2-borónico, ácido 4-metiltiofeno-2-borónico, ácido 5-etiltiofeno-2-borónico, ácido 5-metiltiofeno-2-borónico, ácido 5-bromotiofeno-2-borónico, ácido 5-clorotiofeno-2-borónico, ácido dibenzotiofeno-1-borónico, ácido dibenzofuran-1-borónico, ácido dibenzofuran-4-borónico, ácido picolina-2-borónico, ácido difenilborínico (complejo de etanolamina), ácido 5-metoxitiofeno-2-borónico, ácido tionaftreno-1-borónico, ácido furan-2-borónico, ácido furan-3-borónico, ácido 2,5-dimetil-tiofeno-3-borónico, ácido benzofuran-1-borónico, ácido 3-metoxitiofeno-2-borónico, ácido 5-n-propil-tiofeno-2-borónico, ácido 5-metoxifuran-2-borónico, ácido 3-bromotiofeno-2-borónico, ácido 5-etilfuran-2-borónico, ácido 4-carbazol etil borónico.

[0146] Un ingrediente opcional es un supresor de jabonaduras (por ejemplo, ejemplificado por materiales de polisiloxano alquilado con siliconas y mezclas de sílice-silicona, donde la sílice está en forma de aerogeles y xerogeles de sílice y sílices hidrofóbicas de varios tipos. El supresor de jabonaduras se puede incorporar en forma de partículas, en las que el supresor de jabonaduras está incorporado de manera ventajosa y liberable en un portador impermeable al detergente sustancialmente no tensioactivo soluble en agua o dispersable en agua. Alternativamente, el supresor de jabonaduras puede disolverse o dispersarse en un portador líquido y aplicarse mediante pulverización sobre uno o más de los otros componentes.

[0147] El detergente también puede contener agentes suavizantes orgánicos o inorgánicos. Los agentes suavizantes inorgánicos están ejemplificados por las arcillas de esmectita (5 % a 15 %). Los agentes suavizantes de tejidos orgánicos (0,5 % a 5 %) incluyen las aminas terciarias insolubles en agua y su combinación con sales de amonio cuaternario mono C₁₂-C₁₄ y diamidas de cadena larga, o materiales de óxido de polietileno de alto peso molecular.

[0148] El detergente puede contener también otros ingredientes de detergente convencionales, tales como, por ejemplo, suavizantes, incluidas las arcillas, material defloculante, potenciadores de espuma, depresores de espuma (en depresores de espuma de detergentes lavavajillas) agentes anticorrosivos, agentes suspensores o dispersantes de la suciedad (0 a 10 %), agentes contra la suciedad y la redeposición, tintes, agentes deshidratantes, bactericidas, abrillantadores ópticos, abrasivos, inhibidores de decoloración, agentes colorantes y/o perfumes encapsulados o no encapsulados.

Formulación detergente líquida	
No iónico (Neodol 25-7) AE	25 %
Aniónico (Vista C-S50) LAS	5 %
Trietanolamina	5 %
Etanol	10 %
Estabilizador	0,5, 2,5, 5 %
Proteasa	1 %
Amilasa	0,3 %
Agua	hasta 100 %
Ajustar a pH = 9,0	
Inserto de lipasa tras amilasa	0,001-1 %

Formulaciones detergentes						
Ingredientes	I (%) polvo	II (%) polvo	III (%) polvo	IV (%) polvo	V (%) líquido	VI (%) líquido
Alquilbencenosulfonato lineal (calculado como ácido) o sulfato de alquilo, sulfonato de alfa olefina, ésteres metílicos de ácidos grasos alfa-sulfo, alcanosulfonatos, jabón	7-12	6-11	5-9	8-12	15-21	15-21
Alcohol etoxisulfato (p. ej., alcohol C ₁₂₋₁₈ 1-2 EO) o alquilsulfato (p. ej., C ₁₆₋₁₈)	1-4	1-3	--			
Jabón como ácido graso (p. ej., C ₁₆₋₂₂ o ácido oleico)	--	--	1-3		3-13	3-10
Alcoholetoxilato (p. ej., C ₁₄₋₁₅ o C ₁₂₋₁₅ 7EO o 5EO)	5-9	5-9	7-14	10-25	12-18	3-9
Ácido alquénilsuccínico (C ₁₂₋₁₄)					0-13	
Aminoetanol					8-18	
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	14-20	15-21	10-17	14-22		
Silicato soluble (como Na ₂ O, 2SiO ₂)	2-6	1-4	3-9	1-5		
Zeolita (como NaAlSiO ₄)	15-22	24-34	23-33	25-35		14-22
Sulfato de sodio (como Na ₂ SO ₄)	0-6	4-10	0-4	0-10		
Citrato de sodio/ácido cítrico (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇) o citrato de potasio	0-15	0-15	--		2-8	9-18
Perborato de sodio (como NaBO ₃ .H ₂ O) o borato de sodio (como B ₄ O ₇)	11-18	--	8-16		0-2	0-2
TAED	2-6	--	2-8			
Fosfonato (p. ej., EDTMPA)	--	--	0-1		0-3	
Etanol					0-3	
Carboximetilcelulosa	0-2	0-2	0-2	0-2		0-2
Polímeros (PEG, PVP)					0-3	0-3
Polímeros de anclaje (p. ej., copolímero de ácido maleico/acrílico PVP, PEG)	0-3	1-6	1-3	1-3		0-3
Propilenglicol					8-14	

ES 2 865 080 T3

Formulaciones detergentes						
Glicerol						0-5
Enzimas (lipasas alcalinas)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5
Ingredientes menores (p. ej., jabonaduras, supresores, perfume, abrillantador óptico, fotoblanqueador)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5

Formulaciones detergentes						
Ingredientes	VII (%) polvo	VIII (%) polvo	IX (%) polvo	X (%) líquido	XI (%) líquido	XII (%) polvo
Alquilbencenosulfonato lineal (calculado como ácido) o sulfato de alquilo, sulfonato de alfa olefina, ésteres metílicos de ácidos grasos alfa-sulfo, alcanosulfonatos, jabón		8-14	6-12	15-23	20-32	25-40
Sulfato de alcohol graso	5-10					
Monoetanolamida de ácidos grasos etoxilados	3-9	5-11				
Alcohol etoxisulfato (p. ej., alcohol C ₁₂₋₁₈ 1-2 EO) o C ₁₂₋₁₅ 2-3 EO) o alquilsulfato (p. ej., C ₁₆₋₁₈)				8-15		
Jabón como ácido graso (p. ej., C ₁₆₋₂₂ o ácido oleico o ácido láurico)	0-3	0-3	2-6	0-3		
Alcoholetoxilato (p. ej., C ₁₄₋₁₅ o C ₁₂₋₁₅ 7EO o 5EO)			1-4	3-9	6-12	1-10
Ácido alquenilsuccínico (C ₁₂₋₁₄)						
Aminoetanol				1-5	2-6	
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	5-10	4-10	14-22			8-25
Silicato soluble (como Na ₂ O, 2SiO ₂)	1-4	1-4				5-15
Zeolita (como NaAlSiO ₄)	20-40	30-50	18-32			15-28
Sulfato de sodio (como Na ₂ SO ₄)	2-8	3-11	5-20			0-5
Citrato de sodio/ácido cítrico (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇) o citrato de potasio		5-12	3-8	5-10	8-14	
Hidrotopo (p. ej., toluensulfonato de sodio)				2-6		
Perborato de sodio (como NaBO ₃ .H ₂ O o NaBO ₃ .4H ₂ O) o borato de sodio (como B ₄ O ₇)	12-18		4-9	0-2	1-3	0-20
TAED (o NOBS)	2-7		1-5			0-5
Fosfonato (p. ej., EDTMPA)						
Etanol				1-3		
Carboximetilcelulosa			0-2	0-1		
Polímeros (PEG, PVP)						
Polímeros de anclaje (p. ej., copolímero de ácido maleico/acrílico PVP, PEG)	1-5	1-5	1-5		0-3	
Propilenglicol				2-5		
Glicerol					3-8	
Enzimas (lipasas alcalinas)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5

Formulaciones detergentes						
Ingredientes menores (p. ej., jabonaduras, supresores, perfume, abrillantador óptico, fotoblanqueador)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-3

Modelo aniónico detergente A

[0149] Se prepara un modelo de detergente granulado (90 % aniónico del total de tensioactivos, pH en solución 10,2) mezclando los siguientes ingredientes (% en peso):

- 8,7 % de tensioactivo aniónico: LAS (C₁₀-C₁₃)
- 5 7,4 % de tensioactivo aniónico: AS (C₁₂)
- 1,8 % de tensioactivo no iónico: alcoholetoxilato (C₁₂-C₁₅ 7EO)
- 30 % de zeolita P (Wessalite P)
- 18 % de carbonato de sodio
- 5 % de citrato de sodio
- 10 17 % de sulfato de sodio
- 0,3 % de carboximetilcelulosa
- 6,5 % de percarbonato de sodio monohidratado
- 2,1 % de NOBS

Modelo aniónico detergente B

15 **[0150]** Se prepara un segundo modelo de detergente granulado (79 % aniónico del total de tensioactivos, pH en solución 10,2) mezclando los siguientes ingredientes (% en peso):

- 27 % de tensioactivo aniónico: AS (C₁₂)
- 7 % de tensioactivo no iónico (C₁₂₋₁₅, 7EO)
- 60 % de zeolita P (Wessalite P)
- 20 5 % de carbonato de sodio
- 0,6 % de Sokalan CP5
- 1,5 % de carboximetilcelulosa

Modelo de detergente aniónico/no iónico

25 **[0151]** Se prepara una solución modelo de detergente (32 % aniónico del tensioactivo total, pH 10,2) añadiendo los siguientes ingredientes a 3,2 mM Ca²⁺/Mg²⁺(5:1) en agua pura:

- 0,300 g/l de alquilsulfato (AS; C₁₄₋₁₆);
- 0,650 g/l de alcoholetoxilato (AEO; C₁₂₋₁₄, 6EO);
- 1,750 g/l de zeolita P
- 0,145 g/l de Na₂CO₃
- 30 0,020 g/l de Sokalan CP5
- 0,050 g/l de CMC (carboximetilcelulosa)

Composiciones poco detergentes

Detergente en polvo para lavado de ropa europeo

35 **[0152]** Un 15 % de tensioactivo del cual un 6 % era LAS, un 3 % era AES y un 6 % eran tensioactivos no iónicos. También contenía un 47 % de mejorador que comprendía ácido graso, zeolita A, carbonato y silicato.

[0153] Un 15 % de tensioactivo del cual un 3 % era AES, un 6 % era LAS y un 6 % eran tensioactivos no iónicos. También comprendía un 47 % de mejorador que comprendía ácido graso, zeolita A, carbonato, silicato y comprendía un 5 % de polímeros de policarboxilato.

[0154] Un 15 % de tensioactivo del cual un 3 % era AES, un 6 % era LAS y un 6 % eran tensioactivos no iónicos. También contenía un 47 % de mejorador que comprendía ácido graso, zeolita A, carbonato, silicato y comprendía un 5 % de polímeros de policarboxilato.

5 **[0155]** Un 15 % de tensioactivo del cual un 6 % era LAS, un 3% era AES y un 6 % eran tensioactivos no iónicos. También contenía un 47 % de mejorador que consistía en ácido graso, zeolita A, carbonato y silicato, un 5 % de polímeros de dispersión de policarboxilato, un 15 % de perborato de sodio y un 4 % de tetraacetiletilendiamina (TAEO).

10 **[0156]** Un 15 % de tensioactivo del cual un 6 % era LAS, un 3 % era AES y un 6 % eran tensioactivos no iónicos. También contenía un 47 % de mejorador que consistía en ácido graso, un 22 % de zeolita A, carbonato y silicato, y un 5 % de polímeros de dispersión de policarboxilato.

[0157] Un 15 % de tensioactivo del cual un 6 % era LAS, un 3 % era AES y un 6 % eran tensioactivos no iónicos. También contenía un 47 % de mejorador que consistía en ácido graso, un 22 % de zeolita A, carbonato y silicato, y un 5 % de polímeros de dispersión de policarboxilato.

15 **[0158]** Un 15 % de tensioactivo del cual un 6 % era LAS, un 3 % era AES y un 6 % eran tensioactivos no iónicos. También contenía un 47 % de mejorador que consistía en ácido graso, un 22 % de zeolita A, carbonato y silicato, y un 5 % de polímeros de dispersión de policarboxilato.

[0159] Un 21 % de tensioactivo del cual un 8,1 % era LAS, un 6,5 % era AS, un 4,0 % eran tensioactivos no iónicos y un 2,5 % eran tensioactivos catiónicos (DSDMAC). También contenía un 64 % de mejorador que consistía en ácido graso, carbonato, zeolita A, silicatos y citrato, y también contenía un 2,7 % de polímeros de dispersión.

20 **[0160]** Un 16,9 % de tensioactivos, incluyendo el jabón, de los cuales un 11 % era LAS y un 5,9 % no iónico y un 4,1 % jabón y un 63 % mejoradores.

Detergente líquido para lavado de ropa europeo

25 **[0161]** Un 27 % de tensioactivo del cual un 16,9 % era AS, un 6,7 % eran tensioactivos no iónicos y un 3,5 % eran tensioactivos catiónicos (DSDMAC). También contenía un 18,7 % de mejorador que consistía en ácido graso, carbonato, citrato y ácido bórico.

Detergente líquido para lavado de ropa norteamericano

[0162] Un 23 % de tensioactivo del cual un 16 % era AES, un 5 % era LAS y un 2 % eran tensioactivos no iónicos. También contenía un 6 % de mejorador que comprendía jabón, ácido cítrico, DTPA y formiato cálcico.

30 **[0163]** La reducción del nivel de tensioactivo en la composición detergente a un 50 % del nivel normal y la sustitución por un 0,1 % de proteína lipasa proporcionó un mejor rendimiento.

[0164] Un 23 % de tensioactivo del cual un 16 % era AES, un 5 % era LAS y un 2 % eran tensioactivos no iónicos. También contenía un 6 % de mejorador que consistía en jabón, ácido cítrico, DTPA y formiato cálcico, y un 5 % de polímeros de dispersión de policarboxilato.

Detergente en polvo para lavado de ropa norteamericano

35 **[0165]** Un 16,3% de tensioactivo del cual un 7,8 % era LAS, un 6,7 % era AS y un 1,8 % eran tensioactivos no iónicos, y un 60 % de mejorador que comprendía ácido graso, zeolita A, carbonato y silicato.

[0166] Un 14,9 % de tensioactivo del cual un 11,5 % era AS y un 3,4 % eran tensioactivos no iónicos, y un 55 % de mejorador que comprendía ácido graso, zeolita A, carbonato y silicato.

40 **[0167]** Un 19,5 % de tensioactivo del cual un 4,5 % era LAS, un 13 % era AS y un 2 % eran tensioactivos no iónicos, y un 61 % de mejorador que comprendía ácido graso, zeolita A, carbonato y silicato.

Detergente en polvo para lavado de ropa japonés

[0168] Un 24,3 % de tensioactivo, del cual un 11,1 % era LAS, un 11,6 % era éster sulfonato y un 1,6 % eran tensioactivos no iónicos, y un 60 % de mejorador que comprendía ácido graso, zeolita A, carbonato y silicato.

45 **[0169]** Un 27,9 % de tensioactivo, del cual un 15 27,5 % era LAS y un 0,4 % eran tensioactivos no iónicos y un 64 % de mejorador que comprendía zeolita A, carbonato, citrato, fosfatos y silicato.

Detergente en polvo para lavado de ropa compacto de color europeo

50 **[0170]** Un 21,1 % de un sistema tensioactivo, del cual un 8,1 % era LAS, un 6,5 % era AS, un 2,5 % era Arguat 2T-70 y un 4 % eran tensioactivos no iónicos, y un 64 % de mejorador que comprendía ácido graso, zeolita A, carbonato, ácido cítrico y silicato. El sistema tensioactivo se preparó separadamente del mejorador. El sistema tensioactivo se preparó bien Neodol25-7 o Lutensol ON60 como tensioactivo no iónico.

ES 2 865 080 T3

Composición detergente				
Ingredientes	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4
Material:	Nivel (partes en que está)	Nivel (partes en que está)	Nivel (partes en que está)	Nivel (partes en que está)
Glicerol	3,17	3,17	3,17	3,17
MPG	5,7	5,7	5,7	5,7
NaOH	2,13	2,13	2,13	2,13
TEA	2,05	2,05	2,05	2,05
Neodol 25-7	12,74	12,74	12,74	12,74
F-Tinta	0,18	0,18	0,18	0,18
Ácido cítrico	1,71	1,71	1,71	1,71
LAS (como ácido de LAS)	8,49	8,49	8,49	8,49
Ácido graso	3,03	3,03	3,03	3,03
Empigen BB	1,5	1,5	1,5	1,5
SLES	4,24	4,24	4,24	4,24
Dequest 2066	0,875	0,875	0,875	0,875
Azul patentado	0,00036	0,00036	0,00036	0,00036
Amarillo ácido	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005
Opacificante	0,0512	0,0512	0,0512	0,0512
Perfume	0,734	0,734	0,734	0,734
Bórax	10	10	10	10
Savinase	2,362	2,362	2,362	2,362
Stainzyme	0,945	0,945	0,945	0,945
Jabón	3,03	3,03	3,03	3,03
EPEI 20E0 (ej. Nippon Shokubai) polietilenimina que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 600, y donde la polietilenimina se ha modificado por alcoxilación con una media de 20 fracciones de óxido de etileno	5,5	5,5	5,5	9
LIPASA	3	3	3	3
Polímero de liberación de la suciedad Texcare SRN170 (ej. Clariant)	0	7,5	0	0
Polímero de liberación de la suciedad Sokolan CP5 (ej. BASF)	0	0	20	0

Detergente enzimático y composición blanqueadora	
Ingredientes	% en peso
Dodecilsulfonato de sodio	6,5
Alcohol primario C14-C15, condensado con 11 moles de óxido de etileno	2
Estereato de sodio	1
Silicato de sodio	7

ES 2 865 080 T3

Detergente enzimático y composición blanqueadora	
Carboximetilcelulosa de sodio	0,5
Na ₂ SO ₄	37
Trifosfato de pentasodio	15
Ortofosfato de trisodio	5
Fluorescente	0,2
Ácido tetraacético de etilendiamina	0,5
Agua	6,2
Tintes	0,01
Lipasa	0,001-1
Sistemas blanqueadores	perborato de sodio + SNOBS, perborato de sodio + TAED, DPDA, MPS Todos generan 1,5 mmol de perácido en solución

Detergente enzimático y composición detergente	
Ingredientes	% en peso
Dodecibencenosulfonato de sodio	8,5
Alcohol primario C14-C15, condensado con 11 moles de óxido de etileno	4
Jabón de aceite de colza endurecido con sodio	1,5
Trifosfato de sodio	33
Carbonato de sodio	5
Silicato de sodio	6
Sulfato de sodio	20
Agua	9
Fluorescentes, agentes suspensores de la suciedad, tintes, perfumes	menor cantidad
Gránulos antiespumantes	1,2
Dequest R 2047 (34 % puro)	0,3
Lipasa	0,001-1

Composiciones detergentes		
Ingredientes	% en peso	% en peso
Sulfonato de alquilbenceno de sodio	24	28
Tripolifosfato de pentasodio	15	2,1
Silicato de sodio alcalino	10	12
Carboximetilcelulosa sódica	0,6	0,6
Sulfato	32,5	15,4
Fluorescente	0,4	0,4
Carbonato de sodio	10	35
Varios + agua	hasta 100 %	hasta 100 %
Lipasa	0,001-1	0,001-1

ES 2 865 080 T3

Composiciones detergentes

Composición detergente enzimática	
Ingredientes	% en peso
Dodecibencenosulfonato lineal de sodio	13,35
Sulfato de alcohol de sodio C ₁₂ -C ₁₃ (6.5 E0)	6,67
Carbonato de sodio	54,2
Tripolifosfato de sodio	9,01.
Silicato de sodio	4,6
Hidróxido de sodio	1,66
Carboximetilcelulosa sódica	0,5
Dequest 2006	1,9
Perfume, tinte, agua	q.s.
Lipasa	0,001-1
Proteasa (Alcalasa)	20GU/mL

Formulación detergente para lavado de ropa líquida	
Ingredientes	Partes en peso
Dodecibencenosulfonato de sodio	8,5
Alcohol primario C ₁₂ -C ₁₅ , condensado con 7 moles de óxido de etileno	4
Jabón de aceite de colza endurecido con sodio	1,5
Trifosfato de sodio	33
Carbonato de sodio	5
Silicato de sodio:	6
Sulfato de sodio	20
Agua	9
Fluorescentes, agentes suspensores de la suciedad, tintes, perfumes	menor cantidad
Perborato de sodio	12
Tetraacetil etilendiamina (TAED) (gránulos)	2
Enzima proteolítica (Savinasa ex NOVO)	0,4
Lipasa	0,001-1
Proteasa (Alcalasa)	20GU/mL

Composiciones detergentes líquidas				
	A	B	C	D
Dodecibencenosulfonato de sodio	9	9	9	9

Alcohol primario lineal C13-C15, condensado con 7 moles de óxido de etileno (p. ej., Synperonic A7)	1	4	4	1
Alcohol primario lineal C13-C15, condensado con 3 moles de óxido de etileno (p. ej., Synperonic A3)	3	0	0	3
Tripolifosfato de sodio	23	23	0	0
Zeolita tipo 4A	0	0	24	24
Copolímero de ácido acrílico con anhídrido maleico	0	0	4	4
Poliacrilato de sodio	2	2	0	0
Silicato alcalino	5	5		
Fluorescente	0,25	0,25	0,16	0,16
EDTA	0,15	0,15	0,18	0,18
SCMC	0,5	0,5	0,55	0,55
Sal	2	2	0	0
Sulfato de sodio	26,8	26,8	22,31	22,31
Carbonato de sodio	0	0	10,3	10,3
Humedad	10	10	11	11
TAED	3	3	3,3	3,3
Perborato de sodio monohidratado	10	10	8	8
Calcio Dequest® ²⁰⁴⁷	0,7	0,7	0,3	0,3
Depresor de espuma	3	3	2,5	2,5
Perfume	0,2	0,2	0	0
Proteasa alcalina (Savinasa (A) 6T)	0,4	0,4	0,4	0,4
Lipasa	0,001-1			

Composición para lavado de vajilla	
Ingredientes	% en peso
Tripolifosfato de sodio	24
Carbonato de sodio	20
Disilicato de sodio	11
Alcohol C10 lineal, condensado con 6 moles de óxido de etileno y 24 moles de óxido de propileno	2,5
Sulfato de sodio	44
Agua	hasta 100
Lipasa	0,001-1

5 **[0171]** Las composiciones de limpieza de la presente invención se emplean de manera ventajosa, por ejemplo, en aplicaciones de lavado de ropa, limpieza de superficies duras, aplicaciones de lavado de vajilla, así como en aplicaciones cosméticas como dentaduras postizas, dientes, cabello y piel. Además, debido a las ventajas singulares del aumento de eficacia en las soluciones a temperaturas inferiores, las enzimas de la presente invención son adecuadas idealmente para aplicaciones de lavado de ropa. Asimismo, las enzimas de la presente invención se utilizan en composiciones granuladas y líquidas.

10 **[0172]** Las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención también se utilizan en productos aditivos de limpieza. En algunos modos de realización, se pueden utilizar aplicaciones de limpieza de solución a baja temperatura. En algunos modos de realización, la presente invención proporciona productos aditivos de limpieza que incluyen al menos una enzima de la presente invención que resulta adecuada idealmente para su inclusión en

un proceso de lavado cuando se desee una eficacia de blanqueo adicional. Dichos casos incluyen, aunque sin carácter limitativo, aplicaciones de limpieza de solución a baja temperatura. En algunos modos de realización, el producto aditivo está en su forma más simple; una o más enzimas lipolíticas. En algunos modos de realización, el aditivo se envasa en forma galénica para su adición en un proceso de limpieza. En algunos modos de realización, el aditivo se envasa en forma galénica para su adición en un proceso de limpieza en el que se emplea una fuente de peróxígeno y se desea un aumento de la eficacia de blanqueo. Cualquier unidad de dosis única adecuada se puede utilizar con la presente invención, incluyendo, pero sin carácter limitativo, pastillas, comprimidos, cápsulas u otras unidades de dosis única, como los polvos o líquidos ya medidos. En algunos modos de realización, se incluyen uno o varios materiales de relleno y/o de vehículo para aumentar el volumen de dichas composiciones. Los materiales de relleno o de vehículo adecuados incluyen, sin carácter limitativo, diversas sales de sulfato, carbonato y silicato, así como talco, arcilla y similares. Los materiales de relleno o de vehículo adecuados para composiciones líquidas incluyen, pero sin carácter limitativo, agua o alcoholes primarios y secundarios de bajo peso molecular, incluyendo polioles y dioles. Algunos ejemplos de dichos alcoholes incluyen, sin carácter limitativo, el metanol, etanol, propanol e isopropanol. En algunos modos de realización, las composiciones contienen de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 90 % de dichos materiales. Los rellenos ácidos se utilizan para reducir el pH. Como alternativa, en algunos modos de realización, el aditivo de limpieza incluye ingredientes auxiliares, como se describe de forma más completa más adelante.

[0173] Las presentes composiciones de limpieza y aditivos de limpieza precisan una cantidad efectiva de al menos una de las variantes de enzima lipolítica proporcionadas en la presente memoria sola o combinada con otras enzimas lipolíticas y/o enzimas adicionales. El nivel necesario de enzima se obtiene mediante la adición de una o más variantes de enzima lipolítica de la presente invención. Normalmente, las presentes composiciones de limpieza comprenden al menos aproximadamente un 0,0001 por ciento en peso, de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 o incluso de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 0,1 por ciento en peso de al menos una de las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención.

[0174] Las composiciones de limpieza de la presente memoria se formulan normalmente de modo que, durante su uso en operaciones de limpieza acuosas, el agua de lavado presentará un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 11,5 o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, o incluso de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10,5. Las formulaciones de producto líquido se formulan normalmente para tener un pH puro de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0 o incluso de aproximadamente 3 a aproximadamente 8. Los productos para el lavado de ropa granulados se formulan normalmente para tener un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 o incluso de aproximadamente 8 a aproximadamente 10. Las técnicas para controlar el pH en los niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, álcalis, ácidos, etc., y son ampliamente conocidas por los expertos en la materia.

[0175] Las “composiciones de limpieza con pH bajo” adecuadas tienen normalmente un pH puro de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 y no suelen tener tensioactivos que hidrolizan en dicho entorno de pH. Dichos tensioactivos incluyen tensioactivos de alquil sulfato de sodio que comprenden al menos una fracción de óxido de etileno o incluso desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 16 moles de óxido de etileno. Dichas composiciones de limpieza comprenden normalmente una cantidad suficiente de un modificador de pH, como hidróxido sódico, monoetanolamina o ácido clorhídrico, para proporcionar a dicha composición de limpieza un pH puro desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8. Dichas composiciones comprenden normalmente al menos una enzima estable en ácido. En algunos modos de realización, las composiciones son líquidas, mientras que, en otros modos de realización, estas son sólidas. El pH de dichas composiciones líquidas se mide normalmente como un pH puro. El pH de dichas composiciones sólidas se mide como un 10 % de solución de sólidos de dicha composición donde el disolvente es agua destilada. En estos modos de realización, todas las mediciones del pH se toman a 20 °C, a menos que se indique otra cosa.

[0176] En algunos modos de realización, cuando la(s) variante(s) de enzima(s) lipolítica(s) se emplea(n) en una composición granulada o líquida, se desea que la variante de enzima lipolítica se encuentre en forma de partícula encapsulada para proteger la variante de enzima lipolítica de otros componentes de la composición granulada durante su almacenamiento. Además, la encapsulación también es un medio para controlar la disponibilidad de la variante de enzima lipolítica durante el proceso de limpieza. En algunos modos de realización, la encapsulación potencia el rendimiento de la(s) variante(s) de enzima(s) lipolítica(s) y/o de enzimas adicionales. En este sentido, las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención se encapsulan con cualquier material de encapsulación adecuado conocido en la técnica. En algunos modos de realización, el material de encapsulación normalmente encapsula al menos parte del catalizador para la(s) variante(s) de enzima(s) lipolítica(s) de la presente invención. Normalmente, el material de encapsulación es hidrosoluble y/o dispersable en agua. En algunos modos de realización, el material de encapsulación posee una temperatura de transición vítrea (Tg) de 0 °C o superior. La temperatura de transición vítrea se describe con mayor detalle en el documento WO 97/11151. El material de encapsulación se suele seleccionar entre el grupo que consiste en carbohidratos, gomas naturales o sintéticas, quitina, quitosano, celulosa y derivados de celulosa, silicatos, fosfatos, boratos, alcohol de polivinilo, polietilenglicol, ceras de parafina y combinaciones de los mismos. Cuando el material de encapsulación es un carbohidrato, se selecciona normalmente de entre monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y combinaciones de los mismos.

En algunos modos de realización habituales, el material de encapsulación es un almidón (véanse, p. ej., EP 0 922 499; US 4,977,252; US 5,354,559, y US 5,935,826). En algunos modos de realización, el material de encapsulación es una microesfera hecha de plástico, como termoplásticos, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, poliácrlonitrilo, polimetacrilonitrilo y mezclas de los mismos; entre las microesferas comercializadas que se pueden utilizar se encuentran, sin carácter limitativo, las suministradas por EXPANCEL® (Stockviksverken, Suecia) y PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL® y SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, Pensilvania).

[0177] Tal como se describe en el presente documento, las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención se utilizan en particular en la industria de la limpieza, incluyendo, pero sin carácter limitativo, detergentes para lavado de ropa y de vajilla. Estas aplicaciones someten a las enzimas a varios niveles de exigencia ambiental. Las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención proporcionan ventajas con respecto a muchas enzimas utilizadas en la actualidad debido a su estabilidad en varias condiciones.

[0178] De hecho, existe una variedad de condiciones de lavado, entre las que se incluyen extensiones de tiempo de lavado, temperaturas del agua de lavado, volúmenes del agua de lavado y formulaciones detergentes variables, a las que se exponen las enzimas lipolíticas empleadas en el lavado. Además, las formulaciones detergentes utilizadas en áreas geográficas distintas tienen distintas concentraciones de sus componentes pertinentes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, los detergentes europeos tienen aproximadamente 2000-10000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado, mientras que los detergentes asiáticos tienen aproximadamente 300-2500 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. En América del Norte, concretamente en Estados Unidos, los detergentes suelen tener aproximadamente 300 ppm - 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

[0179] Un sistema de alta concentración de detergente incluye los detergentes en los que más de aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes se encuentran en el agua de lavado. Los detergentes europeos se adscriben, por lo general, a los sistemas de alta concentración de detergente, dado que tienen aproximadamente 2000-10000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

[0180] Los detergentes latinoamericanos son generalmente detergentes con mejoradores de fosfato con altos niveles de jabonadura, y la gama de detergentes utilizada en Latinoamérica puede adscribirse tanto a las concentraciones de detergente medias como a las altas, dado que las mismas varían entre 1500 ppm y 6000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Como se ha mencionado anteriormente, Brasil tiene normalmente aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Sin embargo, otras zonas geográficas con detergentes con mejoradores de fosfato con altos niveles de jabonadura, no limitadas a otros países de Latinoamérica, pueden tener sistemas de alta concentración de detergente de hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

[0181] En vista de lo anterior, resulta evidente que las concentraciones de composiciones detergentes en soluciones de lavado típicas en el mundo varía desde menos de aproximadamente 300 ppm de composición detergente ("zonas geográficas con baja concentración de detergente") hasta 10000 ppm y aproximadamente 6000 ppm en zonas geográficas con detergentes con mejoradores de fosfato con altos niveles de jabonadura.

[0182] Las concentraciones de las soluciones típicas de lavado se determinan de forma empírica. Por ejemplo, en los EE.UU., una lavadora típica soporta un volumen de aproximadamente 64,4 l de solución de lavado. Por consiguiente, para obtener una concentración de aproximadamente 1000 ppm de detergente en la solución de lavado hay que añadir aproximadamente 64,4 g de composición detergente a los 64,4 l de solución de lavado. Esta cantidad es la cantidad típica introducida en el agua de lavado por el usuario al utilizar la taza medidora proporcionada con el detergente.

[0183] Como ejemplo adicional, distintas zonas geográficas utilizan distintas temperaturas de lavado. La temperatura del agua de lavado en Japón es normalmente inferior a la utilizada en Europa. Por ejemplo, la temperatura del agua de lavado en América del Norte y Japón se encuentra normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 °C (p. ej., aproximadamente 20 °C), mientras que la temperatura del agua de lavado en Europa se encuentra normalmente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 °C (p. ej., aproximadamente 40 °C). No obstante, en aras de ahorrar energía, muchos consumidores están pasando a utilizar el lavado en agua fría. Además, en algunas otras regiones, normalmente se emplea agua fría para lavado de ropa, así como para aplicaciones de lavado de la vajilla. En algunos modos de realización, el "lavado en agua fría" de la presente invención utiliza "detergente para agua fría" adecuado para un lavado a temperaturas de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, así como cualquier otra combinación comprendida en el rango de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, y todos los rangos que se encuentren entre 10 °C y 40 °C.

[0184] Como ejemplo adicional, distintas zonas geográficas tienen normalmente distinta dureza del agua. La dureza del agua suele describirse en términos de granos por galón de Ca²⁺/Mg²⁺ mezclados. La dureza es una medida de la cantidad de calcio (Ca²⁺) y magnesio (Mg²⁺) en el agua. La mayoría del agua en Estados Unidos es dura, pero el grado de dureza varía. El agua moderadamente dura (60-120 ppm) a dura (121-181 ppm) tiene de

60 a 181 partes por millón (partes por millón convertido a granos por galón estadounidense es ppm # dividido entre 17,1 y da como resultado granos por galón) de minerales de dureza.

Agua	Granos por galón	Partes por millón
Blanda	inferior a 1,0	inferior a 17
Ligeramente dura	1,0 a 3,5	17 a 60
Moderadamente dura	3,5 a 7,0	60 a 120
Dura	7,0 a 10,5	120 a 180
Muy dura	más de 10,5	más de 180

5 **[0185]** La dureza del agua europea es normalmente mayor que 10,5 (p. ej., aproximadamente de 10,5 hasta aproximadamente 20,0) granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados (p. ej., aproximadamente 15 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados). La dureza del agua norteamericana es normalmente mayor que la dureza del agua japonesa, pero menor que la dureza del agua europea. Por ejemplo, la dureza del agua norteamericana puede ser de entre aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10 granos, aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8 granos, o aproximadamente 6 granos. La dureza del agua japonesa suele ser menor que la dureza del agua norteamericana, normalmente menor que aproximadamente 4, por ejemplo, aproximadamente 3 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados.

10 **[0186]** Por consiguiente, en algunos modos de realización, la presente invención proporciona variantes de enzimas lipolíticas que muestran un rendimiento de lavado sorprendente en al menos un conjunto de condiciones de lavado (p. ej., temperatura del agua, dureza del agua y/o concentración de detergente). En algunos modos de realización, las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención son comparables en términos de rendimiento de lavado con otras enzimas lipolíticas de lipasa. En algunos modos de realización, las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención muestran un rendimiento de lavado potenciado en comparación con las enzimas lipolíticas de lipasa disponibles actualmente en el mercado. Por consiguiente, en algunos modos de realización de la presente invención, las variantes de enzimas lipolíticas proporcionadas en el presente documento muestran una mejor estabilidad oxidativa, una termoestabilidad potenciada, capacidades de limpieza mejoradas en varias condiciones y/o una mayor estabilidad quelante. Además, las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención son de utilidad en composiciones de limpieza que no incluyen detergentes, de nuevo por sí solas o en combinación con mejoradores y estabilizadores.

20 **[0187]** En algunos modos de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza comprenden al menos una variante de enzima lipolítica de la presente invención a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % en peso de la composición, comprendiendo el resto (p. ej., de aproximadamente un 99,999 % a aproximadamente un 90,0 %) materiales de limpieza auxiliares en peso de la composición. En algunos otros modos de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden al menos una variante de enzima lipolítica a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,5 % en peso de la composición, comprendiendo el resto de la composición de limpieza (p. ej., de aproximadamente un 99,9999 % a aproximadamente un 90,0 %, de aproximadamente un 99,999 % a aproximadamente un 98 %, de aproximadamente un 99,995 % a aproximadamente un 99,5 % en peso) de materiales de limpieza auxiliares.

30 **[0188]** En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden una o varias enzimas de detergente adicionales que proporcionan beneficios en cuanto al rendimiento de limpieza y/o al cuidado de tejidos y/o al lavado de vajilla. Algunos ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, sin carácter limitativo, hemicelulasas, celulasas, peroxidasas, enzimas lipolíticas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, estererasas, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanasas, tanasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasas y amilasas o cualquier combinación o mezcla de las mismas. En algunos modos de realización, se utiliza una combinación de enzimas (es decir, un "cóctel") que comprende enzimas aplicables convencionales como la enzima lipolítica, lipasa, cutinasa y/o celulasa junto con amilasa.

40 **[0189]** Por ejemplo, una variante de enzima lipolítica de la invención puede combinarse con una proteasa. Algunas enzimas proteolíticas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. En algunos modos de realización, se utilizan enzimas proteolíticas microbianas. En algunos modos de realización, la enzima proteolítica es preferiblemente una enzima proteolítica microbiana alcalina o una enzima proteolítica de tipo tripsina. Algunos ejemplos de enzimas lipolíticas alcalinas incluyen las lipasas, especialmente las derivadas de *Bacillus* (p. ej., *lentus*, *amyloliquefaciens*, Carlsberg, 309, 147 y 168). Otros ejemplos incluyen las enzimas proteolíticas mutantes descritas en las patentes estadounidenses n.º RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936 y 6,482,628. Algunos ejemplos de proteasas adicionales incluyen, sin carácter limitativo, la tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) y

la enzima proteasa de *Fusarium* descrita en el documento WO 89/06270. En algunos modos de realización, las enzimas proteasas disponibles comercialmente que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero sin carácter limitativo, MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX™, EXCELLASE™ y PURAFAST™ (Genencor); ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYM™, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELEASE® y ESPERASE® (Novozymes); BLAP™ y variantes de BLAP™ (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Düsseldorf, Alemania) y KAP (lipasa de *B. alkalophilus*; Kao Corp., Tokio, Japón). Se describen diversas enzimas proteolíticas en los documentos WO95/23221, WO 92/21760, Pub. Pat. estadounidense n.º 2008/0090747 y Pub. Pat. estadounidense n.º 5,801,039, 5,340,735, 5,500,364, 5,855,625, US RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936 y 6,482,628 y diversas patentes más. En algunos otros modos de realización, se pueden emplear enzimas metaloproteasa en la presente invención, incluida, aunque sin carácter limitativo, la enzima metaloproteasa neutra descrita en el documento WO 07/044993.

[0190] En algunos modos de realización de la presente invención, se puede utilizar cualquier amilasa adecuada en la presente invención. En algunos modos de realización, puede utilizarse cualquier amilasa (por ejemplo, alfa y/o beta) adecuada para su uso en soluciones alcalinas. Entre las amilasas adecuadas se incluyen, pero sin carácter limitativo, las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados genética o químicamente en algunos modos de realización. Entre las amilasas que son de utilidad en la presente invención se incluyen, pero sin carácter limitativo, las α -amilasas obtenidas de *B. licheniformis* (véase, p. ej., GB 1,296,839). Entre las amilasas comercializadas que son de utilidad en la presente invención se incluyen, sin carácter limitativo, DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA® y BAN™ (Novozymes), así como POWERASE™, RAPIDASE® y MAXAMYL® P (Genencor).

[0191] En algunos modos de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, amilasas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a aproximadamente un 10 % de amilasas adicionales en peso de la composición, y el resto de materiales auxiliares de limpieza en peso de la composición. En algunos otros modos de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención también comprenden amilasas a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,5 % de amilasa en peso de la composición.

[0192] En algunos modos de realización adicionales, se puede utilizar cualquier celulosa adecuada en las composiciones de limpieza de la presente invención. Entre las celulasas adecuadas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes química o genéticamente modificados en algunos modos de realización. Las celulasas adecuadas incluyen, pero sin carácter limitativo, celulasas de *Humicola insolens* (véase, p. ej., la pat. estadounidense n.º 4,435,307). Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas que presentan beneficios de cuidado del color (véase, p. ej., EP 0 495 257). Entre las celulasas comercializadas que son de utilidad en la presente invención se incluyen, sin carácter limitativo, CELLUZYME®, CAREZYME® (Novozymes) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation), PURADAX HA 1200E (Danisco), PURADAX EG 7000L (Danisco). En algunos modos de realización, las celulasas se incorporan como partes o fragmentos de celulasas naturales maduras o variantes de celulasas maduras, donde se deleciona una parte del extremo N-terminal (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 5,874,276). En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, celulasas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a aproximadamente un 10 % de celulosa adicional en peso de la composición y el resto de materiales de limpieza auxiliares en peso de la composición. En algunos otros modos de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención también comprenden celulasas a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,5 % de celulosa en peso de la composición.

[0193] También se puede utilizar cualquier mananasa adecuada para su uso en composiciones detergentes en la presente invención. Entre las mananasas adecuadas se incluyen, pero sin carácter limitativo, las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados genética o químicamente en algunos modos de realización. Se conocen varias mananasas que se pueden utilizar en la presente invención (véase, p. ej., la pat. estadounidense n.º 6,566,114, la pat. estadounidense n.º 6,602,842 y la pat. estadounidense n.º 6,440,991). En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, mananasas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a aproximadamente un 10 % de mananasa adicional en peso de la composición, y el resto de materiales de limpieza auxiliares en peso de la composición. En algunos modos de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención también comprenden mananasas a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,5 % de mananasa en peso de la composición.

[0194] En algunos modos de realización, se utilizan peroxididasas en combinación con peróxido de hidrógeno o una fuente del mismo (p. ej., un percarbonato, perborato o persulfato) en las composiciones de la presente invención. En algunos modos de realización alternativos, se utilizan oxidasas en combinación con oxígeno. Ambos tipos de

enzimas se utilizan para “blanquear la solución” (esto es, para evitar la transferencia de un tinte textil de un tejido tintado a otro tejido cuando los tejidos se lavan juntos en una solución de lavado), preferiblemente junto con un agente potenciador (véase, p. ej., WO 94/12621 y WO 95/01426). Entre las peroxidadas/oxidadas adecuadas se incluyen, pero sin carácter limitativo, las de origen bacteriano, vegetal o fúngico. Se incluyen mutantes modificados genética o químicamente en algunos modos de realización. En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, enzimas oxidadas y/o peroxidadas a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % a aproximadamente un 10 % de oxidasa y/o peroxidasa adicional en peso de la composición, y el resto de materiales de limpieza auxiliares en peso de la composición. En algunos otros modos de realización de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención también comprenden enzimas oxidadas y/o peroxidadas a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,5 % de enzimas oxidadas y/o peroxidadas en peso de la composición.

[0195] En algunos modos de realización, se pueden utilizar enzimas adicionales, incluyendo, pero sin carácter limitativo, las perhidrolasas (véase, p. ej., WO 05/056782). Además, en algunos modos de realización, el presente documento abarca mezclas de las enzimas mencionadas anteriormente, en concreto una o más enzimas lipolíticas, amilasas, proteasas, mananetas, y/o al menos una celulasa adicionales. De hecho, se contempla que se podrán utilizar varias mezclas de estas enzimas en la presente invención. También se contempla que los niveles variables de la(s) variante(s) de enzima(s) lipolítica(s) y una o más enzimas adicionales pueden variar de forma independiente hasta aproximadamente un 10 %, constituyendo los materiales de limpieza auxiliares el resto de la composición de limpieza. La selección específica de los materiales de limpieza auxiliares se realiza con facilidad teniendo en cuenta la superficie, el artículo o la tela que va a ser limpiado y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza en el uso (p. ej., mediante el uso de detergente de lavado).

[0196] Entre los ejemplos de materiales de limpieza auxiliares se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., tensioactivos, mejoradores, blanqueadores, activadores del blanqueado, catalizadores del blanqueado, otras enzimas, sistemas estabilizadores de enzimas, quelantes, abrillantadores ópticos, polímeros de liberación de suciedad, agentes de transferencia de tintes, agentes inhibidores de la transferencia de tintes, materiales catalíticos, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de la suciedad de arcilla, agentes elasticantes de la estructura, dispersantes, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, colorantes, sales de relleno, hidrotropos, fotoactivadores, fluorescentes, suavizantes de tejidos, portadores, hidrotropos, coadyuvantes de elaboración, disolventes, pigmentos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes contra el encogimiento, agentes contra la formación de arrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, agentes para el cuidado de la plata, contra la pérdida de lustre y/o contra la corrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, coadyuvantes de elaboración, pigmentos y/o agentes de control del pH (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 6,610,642, 6,605,458, 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 y 5,646,101). A continuación, se ejemplifican de forma detallada algunos modos de realización de materiales de composición de limpieza específicos. En los modos de realización en los que los materiales auxiliares de limpieza no son compatibles con las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención en las composiciones de limpieza, se utilizan métodos adecuados para mantener separados los materiales de limpieza auxiliares y la(s) enzima(s) lipolítica(s) (es decir, que no estén en contacto entre sí) hasta que la combinación de los dos componentes sea adecuada. Dichos métodos de separación incluyen cualquier método adecuado conocido en la técnica (p. ej., cápsulas recubiertas de gelatina, encapsulación, pastillas, separación física, etc.).

[0197] En algunos modos de realización, se incluye una cantidad efectiva de una o más variantes de enzima(s) lipolítica(s) proporcionada(s) en el presente documento en composiciones útiles para limpiar una variedad de superficies que necesitan una eliminación de manchas lipídicas. Dichas composiciones de limpieza incluyen composiciones de limpieza para aplicaciones tales como la limpieza de superficies duras, tejidos y vajilla. De hecho, en algunos modos de realización, la presente invención proporciona composiciones de limpieza de tejidos, mientras que, en otros modos de realización, la presente invención proporciona composiciones de limpieza que no son para tejidos. Se pretende que la presente invención abarque composiciones detergentes en cualquier forma (esto es, líquidas, granuladas, en barra, semisólidas, en gel, en emulsiones, en pastillas, en cápsulas, etc.).

[0198] A modo de ejemplo, varias composiciones de limpieza donde se utilizan las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención se describen con más detalle a continuación. En algunos modos de realización en los que las composiciones de limpieza de la presente invención están formuladas como composiciones adecuadas para su uso en un método o varios métodos de lavado en lavadoras, las composiciones de la presente invención contienen preferiblemente al menos un tensioactivo y al menos un compuesto mejorador, así como uno o más materiales de limpieza auxiliares, preferiblemente, seleccionados de entre compuestos poliméricos orgánicos, agentes blanqueantes, enzimas adicionales, supresores de jabonaduras, dispersantes, dispersantes de jabones de cal, agentes de suciedad en suspensión y contra la redeposición e inhibidores de la corrosión. En algunos modos de realización, las composiciones para lavado de ropa también contienen agentes suavizantes (esto es, como materiales de limpieza auxiliares adicionales). Las composiciones de la presente invención también utilizan productos detergentes aditivos en forma líquida o sólida. Dichos productos aditivos tienen por objeto complementar

y/o potenciar el rendimiento de las composiciones detergentes convencionales y pueden añadirse en cualquier fase del proceso de limpieza. En algunos modos de realización, la densidad de las composiciones detergentes para lavado de ropa varía desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1200 g/litro, mientras que, en otros modos de realización, varía desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 950 g/litro de composición medida a 20 °C.

[0199] En modos de realización formulados como composiciones para su uso en métodos de lavado de vajilla manual, las composiciones de la invención contienen preferiblemente al menos un tensioactivo y preferiblemente al menos un material auxiliar de limpieza adicional seleccionado de entre compuestos poliméricos orgánicos, agentes potenciadores de jabonaduras, iones metálicos del grupo II, disolventes, hidrotopos y enzimas adicionales.

[0200] En algunos modos de realización, varias composiciones de limpieza, tales como las que se proporcionan en la patente estadounidense n.º 6,605,458, se pueden utilizar con las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención. Por consiguiente, en algunos modos de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica de la presente invención son una composición de limpieza de tejidos granulada compacta, mientras que, en otros modos de realización, la composición es una composición de limpieza de tejidos granulada útil para el lavado de tejidos de color; en modos de realización adicionales, la composición es una composición de limpieza de tejidos granulada que proporciona suavizado a través de la capacidad de lavado; en modos de realización adicionales, la composición es una composición de limpieza de tejidos líquida para uso intensivo. En algunos modos de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica de la presente invención son composiciones de limpieza de tejidos como las descritas en las patentes estadounidenses n.º 6,610,642 y 6,376,450. Asimismo, las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención se pueden utilizar en composiciones detergentes para lavado de ropa granuladas, de especial utilidad en las condiciones de lavado de Europa o Japón (véase, p. ej., la pat. estadounidense n.º 6,610,642).

[0201] En algunos modos de realización alternativos, la presente invención da a conocer composiciones de limpieza para superficies duras que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica proporcionada en el presente documento. Así, en algunos modos de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica de la presente invención son una composición de limpieza de superficies duras como las descritas en las patentes estadounidenses n.º 6,610,642, 6,376,450 y 6,376,450.

[0202] En otros modos de realización adicionales, la presente invención proporciona composiciones para lavado de vajilla que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica proporcionada en el presente documento. Así, en algunos modos de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica de la presente invención es una composición de limpieza de superficies duras, tales como las de las patentes estadounidenses n.º 6,610,642 y 6,376,450. En algunos otros modos de realización adicionales, la presente invención da a conocer composiciones para lavado de vajilla que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica proporcionada en el presente documento. En algunos otros modos de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de enzima lipolítica de la presente invención comprenden composiciones de cuidado bucal, tales como las que se describen en las patentes estadounidenses n.º 6,376,450, y 6,376,450. Las formulaciones y descripciones de los compuestos y los materiales de limpieza auxiliares contenidos en las patentes estadounidenses mencionadas anteriormente n.º 6,376,450, 6,605,458, 6,605,458 y 6,610,642, pueden utilizarse con las variantes de enzimas lipolíticas proporcionadas en la presente memoria.

[0203] Las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso seleccionado por el formulador; ejemplos no limitativos de ello se describen en las patentes estadounidenses n.º 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392 y 5,486,303. Cuando se desea una composición de limpieza con un pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material como monoetanolamina o un material ácido como el HCl.

[0204] A pesar de que no son fundamentales para los propósitos de la presente invención, la lista no limitativa de auxiliares ilustrados en lo sucesivo resultan adecuados para su utilización en las composiciones de limpieza instantánea. En algunos modos de realización, estos auxiliares se incorporan, por ejemplo, para potenciar el rendimiento de limpieza o para contribuir al mismo, para el tratamiento del sustrato que se vaya a limpiar o para modificar la apariencia de la composición de limpieza, como es el caso de los perfumes, los colorantes, los tintes o similares. Se entiende que dichos auxiliares son adicionales a las variantes de enzimas lipolíticas de la presente invención. La naturaleza concreta de estos componentes adicionales, así como los niveles de incorporación de los mismos, dependerán de la forma física de la composición y de la naturaleza de la operación de limpieza para la que se va a utilizar. Los materiales auxiliares adecuados incluyen, sin carácter limitativo, tensioactivos, adyuvantes, quelantes, inhibidores de la transferencia de tinte, auxiliares de deposición, dispersantes, enzimas adicionales y estabilizadores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores del blanqueo, potenciadores del blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de la suciedad de arcilla/antirredeposición, blanqueadores, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastificantes de la estructura, suavizantes de tejidos, portadores, hidrotropos, auxiliares de procesamiento y/o pigmentos. Además de en la exposición que se presenta más abajo, pueden encontrarse ejemplos adecuados de dichos otros auxiliares y niveles de uso en las patentes estadounidenses n.º 5,576,282,

6,306,812 y 6,326,348. Los ingredientes auxiliares mencionados anteriormente pueden constituir el resto de las composiciones de limpieza de la presente invención.

[0205] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de acuerdo con la presente invención comprenden al menos un tensioactivo y/o un sistema tensioactivo, donde el tensioactivo se selecciona de entre
 5 tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfólicos, tensioactivos zwitteriónicos, tensioactivos no iónicos semipolares y mezclas de los mismos. En algunos modos de realización de composiciones de limpieza con un pH bajo (por ejemplo, composiciones que presentan un pH puro de 3 aproximadamente a aproximadamente 5), la composición no contiene normalmente sulfato de alquilo etoxilado, puesto que se cree que dicho tensioactivo puede que hidrolice por medio de dichas composiciones los contenidos
 10 ácidos. En algunos modos de realización, el tensioactivo está presente a un nivel desde aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 60 %, mientras que, en modos de realización alternativos, el nivel es de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 50 %, mientras que, en otros modos de realización adicionales, el nivel es de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % en peso de la composición de limpieza.

[0206] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden uno
 15 o varios mejoradores o sistemas mejoradores de detergentes. En algunos modos de realización que incorporan al menos un mejorador, las composiciones de limpieza comprenden al menos aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 60 %, o incluso de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % de mejorador en peso de la composición de limpieza. Entre los mejoradores se incluyen, aunque sin carácter limitativo, las sales de metales alcalinos, amonio y alcanolamónio de polifosfatos, silicatos de metales
 20 alcalinos, carbonatos de metales alcalinotérreos y alcalinos, aluminosilicatos, compuestos de policarboxilato, hidroxipolicarboxilatos de éter, copolímeros de anhídrido maleico con etileno o vinilmetiléter, ácido 1,3,5-trihidroxi benceno-2, 4, 6-trisulfónico y ácido carboximetiloxisuccínico, las diversas sales de metales alcalinos, de amonio y de amonio sustituido de ácidos poliacéticos, como el ácido tetraacético de etilendiamina y el ácido nitrilotriacético, así como policarboxilatos, tales como el ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidisuccínico, ácido
 25 polimaleico, ácido de benceno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxisuccínico y sales solubles de los mismos. De hecho, se contempla que se podrá utilizar cualquier mejorador adecuado en diversos modos de realización de la presente invención.

[0207] En algunos modos de realización, los mejoradores forman complejos hidrosolubles de iones de dureza (p. ej., mejoradores secuestrantes), tales como citratos y polifosfatos (p. ej., tripolifosfato de sodio y tripolifosfato de sodio hexahidratado, tripolifosfato de potasio, y tripolifosfato con mezcla de sodio y potasio, etc.). Se contempla que se podrá utilizar cualquier mejorador adecuado en la presente invención, incluyendo los que se conocen en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0208] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención contienen al menos un agente quelante. Entre los agentes quelantes adecuados se incluyen, aunque sin carácter limitativo, los
 35 agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y mezclas de los mismos. En modos de realización en los que se utiliza al menos un agente quelante, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 15 % o incluso de aproximadamente un 3,0 % a aproximadamente un 10 % de agente quelante en peso de la composición de limpieza en cuestión.

[0209] En algunos otros modos de realización adicionales, las composiciones de limpieza expuestas en el presente documento contienen al menos un coadyuvante de deposición. Los coadyuvantes de deposición adecuados incluyen, aunque sin carácter limitativo, polietilenglicol, polipropilenglicol, policarboxilato, polímeros de liberación de suciedad como el ácido politereftálico, arcillas como caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita y mezclas de estas.

[0210] Como se indica en el presente documento, en algunos modos de realización, los agentes antirredeposición se pueden utilizar en algunos modos de realización de la presente invención. En algunos modos de realización, se utilizan tensioactivos no iónicos. Por ejemplo, en modos de realización de lavado de vajilla automático, se pueden utilizar tensioactivos no iónicos para fines de modificación de superficies, en concreto para el laminado, para evitar la formación de películas y manchas, y para mejorar el brillo. Estos tensioactivos no iónicos también se utilizan para prevenir la redeposición de suciedad. En algunos modos de realización, el agente antirredeposición es un
 50 tensioactivo no iónico según se conoce en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0211] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen uno o más agentes inhibidores de transferencia de tintes. Los agentes inhibidores de transferencia de tintes poliméricos adecuados incluyen, sin carácter limitativo, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los
 55 mismos. En modos de realización en los que se utiliza al menos un agente inhibidor de transferencia de tintes, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 5 %, o incluso de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 3 % en peso de la composición de limpieza.

[0212] En algunos modos de realización, se incluyen silicatos en las composiciones de la presente invención. En algunos de dichos modos de realización, se utilizan silicatos de sodio (p. ej., disilicato de sodio, metasilicato de

sodio y filosilicatos cristalinos). En algunos modos de realización, los silicatos están presentes a un nivel de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %. En algunos modos de realización, los silicatos están presentes a un nivel de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % en peso de la composición.

5 **[0213]** En algunos otros modos de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la presente invención también contienen dispersantes. Los materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen, sin carácter limitativo, los ácidos homopoliméricos o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.

10 **[0214]** En algunos otros modos de realización, las enzimas utilizadas en las composiciones de limpieza se estabilizan mediante cualquier técnica adecuada. En algunos modos de realización, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones calcio y/o magnesio en las composiciones finalizadas que aportan dichos iones a las enzimas. En algunos modos de realización, los estabilizadores de enzimas incluyen oligosacáridos, polisacáridos y sales metálicas divalentes inorgánicas, incluidos metales alcalinotérreos, como sales de calcio. Se contempla que se utilizarán diversas técnicas para la estabilización enzimática en la presente invención. Por ejemplo, en algunos modos de realización, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes hidrosolubles de iones zinc (II), calcio (II) y/o magnesio (II) en las composiciones acabadas que aportan dichos iones a las enzimas, así como otros iones metálicos (por ejemplo, bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II) y oxovanadio (IV)). Los cloruros y los sulfatos también se utilizan en algunos modos de realización de la presente invención. En la técnica, se conocen ejemplos de oligosacáridos y polisacáridos adecuados (p. ej., dextrinas) (véase, p. ej., WO 07/145964). En algunos modos de realización, también se utilizan los inhibidores reversibles de enzimas, como los compuestos que contienen boro (p. ej., borato, ácido 4-formil fenil borónico) y/o se puede utilizar un aldehído tripeptídico para mejorar además la estabilidad, según se prefiera.

25 **[0215]** En algunos modos de realización, se incluyen blanqueadores, activadores de blanqueo y/o catalizadores de blanqueo en las composiciones de la presente invención. En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden compuesto(s) blanqueador(es) orgánico(s) y/o inorgánico(s). Entre los blanqueadores inorgánicos se incluyen, sin carácter limitativo, las sales perhidratadas (p. ej., sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato). En algunos modos de realización, las sales perhidratadas inorgánicas son sales de metales alcalinos. En algunos modos de realización, se incluyen sales perhidratadas inorgánicas como el sólido cristalino, sin protección adicional, aunque, en algunos otros modos de realización, la sal se encuentra cubierta. En la presente invención, se puede utilizar cualquier sal adecuada que se conozca en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949).

30 **[0216]** En algunos modos de realización, se utilizan activadores de blanqueo en las composiciones de la presente invención. Los activadores de blanqueo son normalmente precursores de perácidos orgánicos que potencian la acción blanqueante durante la limpieza con temperaturas de 60 °C e inferiores. Entre los activadores de blanqueo adecuados para su uso según el presente documento se incluyen compuestos que, en condiciones de perhidrólisis, proporcionan ácidos peroxicarboxílicos alifáticos que poseen preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, en concreto, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono y/u, opcionalmente, ácido perbenzoico sustituido. En la técnica, se conocen activadores de blanqueo adicionales que se pueden utilizar en la presente invención (véase, p. ej., EP 2 100 949).

40 **[0217]** Además, en algunos modos de realización y, según se describe además en el presente documento, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, al menos un catalizador de blanqueo. En algunos modos de realización, son de utilidad el triazaciclononano de manganeso y otros complejos relacionados, así como complejos de cobalto, cobre, manganeso y hierro. En la presente invención, son de utilidad catalizadores del blanqueo adicionales (véase, p. ej., US 4,246,612, 5,227,084, 4,810,410, WO 99/06521, y EP 2 100 949).

45 **[0218]** En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención contienen uno o más complejos metálicos catalíticos. En algunos modos de realización, se utiliza un catalizador de blanqueo que contiene metal. En algunos modos de realización, el catalizador de blanqueo metálico comprende un sistema catalizador que comprende un catión de metal de transición de actividad catalítica de blanqueo definida (por ejemplo, cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno o manganeso), un catión de metal auxiliar que presenta una actividad catalítica de blanqueo mínima o nula (p. ej., cationes de zinc o de aluminio) y un secuestrante que presenta unas constantes de estabilidad definidas para los cationes metálicos catalíticos y auxiliares, en concreto ácido etilendiaminotetraacético, ácido etilendiamino tetra (metileno-fosfónico) y sales hidrosolubles de los mismos (véase, por ejemplo, la pat. estadounidense n.º 4,430,243). En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se catalizan por medio de un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y niveles de uso resultan ampliamente conocidos en la técnica (véase, p. ej., la pat. estadounidense n.º 5,576,282). En modos de realización adicionales, los catalizadores de blanqueo de cobalto se utilizan en las composiciones de limpieza de la presente invención. En la técnica, se conocen diversos catalizadores de blanqueo de cobalto (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 5,597,936 y 5,595,967) y se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos.

[0219] En algunos modos de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen un complejo de metal de transición de un ligando macropolicíclico rígido (MRL). A modo práctico, y no a modo limitativo, en algunos modos de realización, las composiciones y procesos de limpieza proporcionados en la presente invención se ajustan para proporcionar del orden de al menos una parte por cien millones de la especie de MRL activa en el medio de lavado acuoso y, en algunos modos de realización, proporcionan de 0,005 ppm a aproximadamente 25 ppm, más preferiblemente, de aproximadamente 0,05 ppm a aproximadamente 10 ppm, y siendo lo más preferible de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 5 ppm del MRL en el agua de lavado.

[0220] En algunos modos de realización, los metales de transición en el catalizador de blanqueo instantáneo de metal de transición incluyen, aunque sin carácter limitativo, el manganeso, el hierro y el cromo. Los MRL también incluyen, sin carácter limitativo, ligandos ultrarrígidos especiales que están entrecruzados (p. ej., 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano). Los MRL adecuados de metales de transición se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos (véase, p. ej., WO 2000/32601 y la pat. estadounidense n.º 6,225,464).

[0221] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden agentes para el cuidado de metales. Los agentes para el cuidado de metales se pueden utilizar para prevenir y/o reducir la pérdida de lustre, la corrosión y/o la oxidación de los metales, incluidos el aluminio, el acero inoxidable y metales no ferrosos (p. ej., plata y cobre). Entre los agentes para el cuidado de los metales adecuados se incluyen los descritos en EP 2 100 949, WO 9426860 y WO 94/26859). En algunos modos de realización, el agente para el cuidado de metales es una sal de zinc. En algunos modos de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 % en peso de uno o más agentes para el cuidado de metales.

[0222] Tal como se ha indicado anteriormente, las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso seleccionado por el formulador; ejemplos no limitativos de ello se describen en las patentes estadounidenses n.º 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,516,448, 5,489,392 y 5,486,303. En algunos modos de realización en que se desea una composición de limpieza con un pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material ácido como el HCl.

[0223] Las composiciones de limpieza expuestas en el presente documento son de utilidad en la limpieza de un sitio (p. ej., una superficie, vajilla, artículo, o tejido). Normalmente, al menos una parte del sitio se pone en contacto con un modo de realización de la presente composición de limpieza, en su forma pura o diluida en una solución de lavado, y a continuación el sitio se lava y/o aclara de manera opcional. A efectos de la presente invención, el "lavado" incluye, sin carácter limitativo, frotado y agitación mecánica. En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza normalmente se usan en concentraciones de 300 ppm aproximadamente a 15 000 ppm aproximadamente en solución. Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua normalmente oscila entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 90 °C y, cuando el sitio comprende un tejido, la relación de masa agua/tejido normalmente va de 1:1 aproximadamente a 30:1 aproximadamente.

Procesos de elaboración y uso de las composiciones de limpieza

[0224] Las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso adecuado elegido por el formulador (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392, 5,486,303, 4,515,705, 4,537,706, 4,515,707, 4,550,862, 4,561,998, 4,597,898, 4,968,451, 5,565,145, 5,929,022, 6,294,514 y 6,376,445).

[0225] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se proporcionan en formato de dosis unitaria, lo que incluye pastillas, cápsulas, sobres, bolsas y bolsas con múltiples compartimentos. En algunos modos de realización, el formato de dosis unitaria está diseñado para ofrecer una liberación controlada de los ingredientes que se encuentran en el interior de una bolsa con múltiples compartimentos (u otro formato de dosis unitaria). Los formatos de dosis unitaria y de liberación controlada se conocen en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949, WO 02/102955, US Pat. n.º 4,765,916 y 4,972,017, y WO 04/111178 para materiales adecuados para su uso en formatos de dosis unitaria y de liberación controlada). En algunos modos de realización, el formato de dosis unitaria se proporciona en pastillas envueltas por una película soluble en agua o en bolsas solubles en agua. En el documento EP 2 100 947, se proporcionan varios formatos para dosis unitarias que son conocidos en la técnica.

Métodos de uso

[0226] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se utilizan en la limpieza de superficies (p. ej., vajilla), ropa, superficies duras, lentes de contacto, etc. Al menos una parte de la superficie se puede poner en contacto con al menos un modo de realización de las composiciones de limpieza de la presente invención, en forma pura o diluida en una solución de lavado y, luego, la superficie se lava y/o aclara de manera opcional. A efectos de la presente invención, el "lavado" incluye, sin carácter limitativo, frotado y agitación mecánica. En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención se usan en concentraciones de 500 ppm aproximadamente a 15 000 ppm aproximadamente en solución. Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua normalmente varía de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 90 °C.

[0227] En la presente memoria, se proporcionan métodos para limpiar o lavar un artículo o superficie (p. ej., superficie dura) que necesita limpiarse, incluidos, sin carácter limitativo, p. ej., métodos para limpiar o lavar un artículo de vajilla, un artículo de mesa, un artículo de tejido, un artículo de colada, un artículo de cuidado personal, etc., o similares, como, p. ej., una superficie dura de un artículo.

5 **[0228]** Por ejemplo, se proporciona un método para limpiar un artículo, un objeto o una superficie que necesite limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o la superficie (o una parte del artículo o la superficie que se desee limpiar) con al menos una variante de enzima lipolítica de lipasa de la presente invención o una composición de la presente invención durante un tiempo suficiente y/o en condiciones adecuadas y/o efectivas para limpiar el artículo, el objeto, o la superficie hasta un nivel deseado. Algunos de dichos métodos comprenden también enjuagar el artículo, el objeto o la superficie con agua. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para lavado de la vajilla y el artículo o el objeto que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. Tal como se entiende en el presente documento, un “artículo de vajilla” es un artículo utilizado generalmente para servir o comer alimentos. Un artículo de vajilla puede ser, sin carácter limitativo, p. ej., un plato, un plato llano, un plato hondo, una copa, etc., y similares. Tal como se entiende en el presente documento, “artículo de mesa” es un término más amplio que incluye, sin carácter limitativo, por ejemplo, platos, cubiertos, cuchillos, tenedores, cucharas, palillos chinos, artículos de cristal, jarras, salseras, recipientes para beber, artículos para servir etc. Se pretende que “artículo de mesa” incluya cualquiera de estos artículos para servir o comer alimentos, o artículos similares. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para lavado de la vajilla de forma automática o una composición detergente para lavado de la vajilla a mano y el artículo o el objeto que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para lavado de ropa (p. ej., una composición detergente para lavado de ropa en polvo o una composición detergente para lavado de ropa líquida), y el artículo que se va a limpiar es un artículo de tejido. En otros modos de realización adicionales, la composición de limpieza es una composición de tratamiento previo al lavado de ropa.

25 **[0229]** Por ejemplo, se proporcionan métodos para limpiar o lavar un artículo de tejido que necesite, opcionalmente, limpiarse o lavarse, respectivamente. En algunos casos, los métodos comprenden proporcionar una composición que comprende la variante de enzima lipolítica (incluyendo, pero sin carácter limitativo, una composición de limpieza para lavado de ropa o para tejidos) y un artículo de tejido o artículo de colada que necesite limpiarse, y poner en contacto el artículo de tejido o el artículo de colada (o una parte del artículo que se desee limpiar) con la composición en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo de tejido o de colada hasta un nivel deseado.

35 **[0230]** En el presente documento, se proporciona un método para limpiar o lavar un artículo o una superficie (p. ej., una superficie dura) que, de forma opcional, necesite limpiarse, comprendiendo el método proporcionar un artículo o una superficie que se va a limpiar o lavar y poner en contacto el artículo o la superficie (o una parte del artículo o la superficie que se desee limpiar o lavar) con al menos una variante de lipasa de la invención o una composición de la invención que comprende al menos una variante de lipasa tal durante un tiempo suficiente y/o en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta un nivel deseado. Dichas composiciones incluyen, sin carácter limitativo, por ejemplo, una composición de limpieza o una composición detergente de la invención (p. ej., una composición detergente para el lavado de la vajilla a mano, una composición de limpieza para tejidos o la colada o una composición detergente para tejidos o la colada, una composición de limpieza para lavado de ropa líquida, un detergente para lavado de ropa líquida, una composición de limpieza para lavado de ropa en polvo, una composición detergente para lavado en polvo, una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática, una composición detergente o de limpieza potenciadora para lavado, un aditivo de limpieza para lavado de ropa y una composición de pretratado para lavado de ropa, etc.). En algunos casos, el método se repite una o varias veces, especialmente si se desea limpieza o lavado adicional. Por ejemplo, en algunos casos, el método también comprende de forma opcional permitir que el artículo o la superficie permanezca en contacto con la al menos una variante de enzima lipolítica o composición durante un período de tiempo suficiente o efectivo para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta el nivel deseado. En algunos casos, los métodos comprenden además aclarar el artículo o superficie con agua y/u otro líquido. En algunos casos, los métodos comprenden también poner en contacto de nuevo el artículo o la superficie con al menos una variante de enzima lipolítica de la invención o una composición de la invención y permitir que el artículo o la superficie permanezcan en contacto con la al menos una variante de enzima lipolítica o composición durante un período de tiempo suficiente para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta el nivel deseado. En algunos casos, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla y el artículo que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. En algunos casos de los presentes métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática o una composición detergente para el lavado de la vajilla a mano y el artículo que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. En algunos casos de los métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para lavado de ropa y el artículo que se va a limpiar es un artículo de tejido.

[0231] Asimismo, se proporcionan métodos para limpiar un artículo de mesa o un artículo de vajilla en un lavavajillas automático, comprendiendo el método proporcionar un lavavajillas automático, poner una cantidad de

una composición para el lavado de la vajilla de forma automática que comprende al menos una variante de lipasa de la presente invención o una composición de la invención suficiente para limpiar el artículo de mesa o el artículo de vajilla en el lavavajillas (p. ej., poniendo la composición en un compartimento o dispensador de detergente proporcionado o adecuado en la máquina), colocar un artículo de mesa o de vajilla en el lavavajillas y poner en funcionamiento la máquina con el fin de limpiar el artículo de mesa o el artículo de vajilla (p. ej., de acuerdo con las instrucciones del fabricante). En algunos casos, los métodos incluyen cualquier composición para el lavado de vajilla que se describe en el presente documento que comprende, pero sin carácter limitativo, al menos una variante de lipasa proporcionada en el presente documento. La cantidad de composición para el lavado de vajilla de forma automática que se ha de emplear puede determinarse fácilmente según las instrucciones o las sugerencias del fabricante y puede emplearse cualquier forma de la composición para el lavado de vajilla de forma automática que comprende al menos una variante de enzima lipolítica de la invención (p. ej., líquida, en polvo, sólida, en gel, en pastilla, etc.), incluyendo cualquiera descrita en el presente documento.

[0232] En el presente documento, también se proporcionan métodos para limpiar una superficie, un artículo o un objeto que, de forma opcional, necesite limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o la superficie (o una parte del artículo o la superficie que se desee limpiar) con al menos una variante de lipasa de la presente invención o una composición de limpieza de la invención en forma pura o diluida en una solución de lavado durante un tiempo suficiente y/o en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta un nivel deseado. Posteriormente, la superficie, el artículo o el objeto pueden lavarse y/o enjuagarse (de forma opcional) si se desea. A efectos de la presente invención, el "lavado" incluye, sin carácter limitativo, por ejemplo, frotado y agitación mecánica. En algunos casos, las composiciones de limpieza se usan en concentraciones de aproximadamente 500 ppm hasta aproximadamente 15 000 ppm en una solución (p. ej, solución acuosa). Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua normalmente oscila entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 90 °C y, cuando la superficie, artículo u objeto comprende un tejido, la relación de masa agua/tejido normalmente va de 1:1 aproximadamente a 30:1 aproximadamente.

[0233] En la presente exposición, también se proporcionan métodos para limpiar un artículo de colada o un artículo de tejido en una lavadora, comprendiendo el método proporcionar una lavadora, poner una cantidad de una composición detergente para lavado de ropa que comprende al menos una variante de lipasa de la invención suficiente para limpiar el artículo de colada o el artículo de tejido en la máquina (p. ej., poniendo la composición en un compartimento o dispensador de detergente proporcionado o adecuado en la máquina), colocar el artículo de colada o el artículo de tejido en la máquina, y poner en funcionamiento la máquina con el fin de limpiar el artículo de colada o el artículo de tejido (p. ej., de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Los métodos incluyen cualquier composición detergente para el lavado de ropa descrita en la presente memoria, comprendiendo, entre otras, al menos una variante de lipasa proporcionada en la presente memoria. La cantidad de composición detergente para lavado de ropa que se ha de emplear puede determinarse fácilmente según las instrucciones o las sugerencias del fabricante y puede emplearse cualquier forma de la composición detergente para lavado de ropa que comprende al menos una variante de enzima lipolítica de la invención (p. ej., sólida, en polvo, líquida, en pastilla, en gel, etc.), incluyendo cualquiera descrita en el presente documento.

[0234] La presente exposición también da a conocer variantes, tales como variantes de TLL, con actividad de esterasa. La actividad de esterasa incluye escisión en ésteres, por ejemplo, formas solubles monoméricas de triglicéridos. Se pueden usar variantes de la invención en presencia de adyuvantes, incluidos adyuvantes no iónicos o zwitteriónicos, por ejemplo, n-Dodecil-beta-D-maltopiranosido (D310), LysoFos Colina 14 (L214), Anzergent 3-12 (AZ312) y CHAPSO (C317). Se pueden usar variantes de la invención con diferentes concentraciones de niveles de adyuvante, que incluyen, pero no se limitan a, IX, 0,5X y 0,25X de concentración micelar crítica (CMC).

[0235] También se proporcionan variantes, como variantes de TLL, útiles para el procesamiento de pulpa y papel, incluido el control de contaminantes orgánicos en fibras. Las fibras pueden ser fibras de celulosa y, en algunos casos, son fibras recicladas de una variedad de productos de papel o productos que contienen fibra, como envases corrugados viejos (OCC, por sus siglas en inglés), papel de periódico viejo (ONP, por sus siglas en inglés), desechos de oficina mixtos (MOW, por sus siglas en inglés) o combinaciones de los mismos. Estos tipos de productos que contienen papel normalmente contienen grandes cantidades de contaminantes orgánicos que están presentes en los productos de papel. Cuando estos tipos de productos de papel se reciclan, estos contaminantes orgánicos están presentes junto con las fibras formadas durante la etapa de fabricación de pasta de un proceso de fabricación de papel. Estos contaminantes orgánicos, si no se eliminan sustancialmente, pueden interferir gravemente con las etapas posteriores del proceso de fabricación de papel al afectar la calidad de las hojas de papel resultantes formadas y/o afectar a la maquinaria utilizada para formar el papel. Por consiguiente, la eliminación de dichos contaminantes orgánicos es importante para el proceso de fabricación de papel cuando dichos contaminantes orgánicos están presentes en las fibras.

[0236] Los ejemplos de contaminantes orgánicos incluyen lo que se conoce en la industria como "adhesivos" e incluyen, entre otros, polímeros sintéticos resultantes de adhesivos y similares, colas, colas de fusión, revestimientos, aglutinantes de revestimiento, residuos de tinta, productos químicos para destintar, resinas de madera, colofonia y resinas de resistencia en húmedo sin destruir. Estos tipos de materiales se encuentran típicamente en productos que contienen papel, como papel de periódico, envases corrugados y/o desechos de oficina mixtos. Estos contaminantes orgánicos tendrán típicamente presentes polímeros, tales como caucho

estireno butadieno, acrilatos de vinilo, poliisopreno, polibutadieno, caucho natural, acetatos de etilvinilo, acetatos de polivinilo, alcoholes etilvinílicos, alcoholes polivinílicos, acrilatos de estireno y otros polímeros de tipo sintético.

5 **[0237]** En el proceso, estos contaminantes orgánicos se controlan poniendo en contacto la fibra que contiene los contaminantes orgánicos con una composición que contiene al menos una variante de la presente invención durante un tiempo suficiente y en una cantidad suficiente para controlar los contaminantes orgánicos presentes en la fibra. Las composiciones preferiblemente dispersan o convierten los contaminantes orgánicos en especies orgánicas que no afectan al proceso de fabricación de papel. Por ejemplo, los acetatos de polivinilo, preferiblemente, se dispersan y/o se convierten en alcoholes polivinílicos, que no afectan al proceso de fabricación de papel. Esta forma preferida de que las composiciones logren el control de los contaminantes orgánicos es bastante diferente de la recogida de contaminantes por flotación.

10 **[0238]** El control de los contaminantes orgánicos presentes en las fibras que tienen contaminantes orgánicos puede entenderse como uno o más de los siguientes: reducir el tamaño de las partículas contaminantes, reducir el número o la cantidad de partículas medibles presentes y/o reducir la pegajosidad de los contaminantes orgánicos. En algunos casos, cuando se controlan los contaminantes orgánicos mediante los métodos, se producen todas estas reducciones. En algunos casos, la reducción del tamaño de las partículas contaminantes es de al menos aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 75 % en comparación con cuando no está presente ninguna variante. De manera similar, la reducción del número o la cantidad de contaminantes orgánicos presentes en la fibra se reduce en al menos aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 75 % en comparación con las fibras que no han sido tratadas con una variante. De manera similar, la reducción de pegajosidad de los contaminantes orgánicos puede reducirse en al menos aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 75 % en comparación con las fibras que no han sido tratadas con una variante.

15 **[0239]** Las composiciones que contienen al menos una variante también pueden contener opcionalmente otros productos químicos o ingredientes convencionales para el tratamiento del papel tales como, entre otros, los tensioactivos, disolventes, adyuvantes de suspensión, rellenos, quelantes, conservantes, tampones, agua, estabilizadores y similares. Estos ingredientes adicionales pueden estar presentes en cantidades convencionales.

20 **[0240]** Se proporciona un método para tratar poliéster, incluyendo poliéster limpio y sin ensuciar, que comprende poner en contacto dicho tejido de poliéster con una solución enzimática que tiene una variante durante un tiempo y en condiciones tales que las propiedades del poliéster se modifican. Preferiblemente, el poliéster es una fibra, un hilo, tejido o producto textil acabado que comprende tal fibra, hilo o tejido. Más preferiblemente, las propiedades que se modifican comprenden aquellas tales como el tacto, el tacto y/o peso mejorados de un tejido hecho de tal fibra, hilo o artículo. En algunos casos, se proporciona un mecanismo para modificar las características textiles de un tejido que comprende poliéster. Por tanto, en este caso, a menudo es ventajoso aplicar la poliesterasa a productos textiles que no están manchados, es decir, que no comprenden manchas que se someten típicamente a detergentes comerciales para el lavado de ropa. En otros casos, se proporciona un método para lavar las manchas de tejidos de poliéster.

25 **[0241]** También se proporciona un método para tratar una fibra, hilo o tejido de poliéster, antes de su incorporación a un producto textil o la aplicación de un acabado textil con una variante enzimática de la presente invención durante un tiempo y en condiciones tales que se modifican las propiedades del poliéster. En consecuencia, en caso de que los componentes textiles se traten por separado, los componentes de poliéster tratados (es decir, fibras, hilos, tejidos) se pueden incorporar a un producto textil a través de métodos estándar para producir tejidos de poliéster; por ejemplo, procesos como el tejido, la costura y el corte y cosido, confiriendo así las modificaciones al producto textil acabado.

30 **[0242]** También se proporciona un método para tratar una resina o película de poliéster con una variante de enzima durante un tiempo y en unas condiciones para modificar las propiedades del poliéster. El poliéster tratado puede ser un producto de resina o película acabado o puede incorporarse a un producto mediante, por ejemplo, construcción mecánica, confiriendo así las modificaciones al producto textil acabado.

35 **[0243]** En otro método más, un producto de desecho de poliéster se trata con una variante enzimática para degradar el producto de desecho de poliéster para eliminar o reciclar fácilmente los compuestos. Este caso es particularmente útil en la degradación de plásticos a base de poliéster que se están volviendo cada vez más problemáticos en la eliminación y el vertido de residuos. Una alternativa de este caso es el uso para aumentar la cantidad de material digerible de forma microbiana en un producto de desecho para facilitar la degradación completa o el compostaje de dichos desechos.

40 **[0244]** En el método de acuerdo con, la solución que contiene una variante enzimática de la presente invención como se proporciona en este documento puede ponerse en contacto con la fibra, el hilo, tejido o textil de poliéster que comprende tal fibra, hilo o tejido en condiciones adecuadas para que la enzima presente una modificación de poliéster. La presente exposición está orientada, preferiblemente, al uso de la poliesterasa en la fabricación del producto textil y no necesariamente en combinación con un detergente con el fin de eliminar las manchas que se producen durante el uso. Así, en este caso, la aplicación de la variante enzimática de la presente invención al artículo de poliéster se produce antes del hilado de la fibra en un hilo, antes de la incorporación del hilo en un tejido

y/o antes de la construcción del producto textil que comprende el poliéster. Sin embargo, también se prefiere tratar el producto textil terminado con la variante enzimática de la presente invención identificada en el presente documento.

INVESTIGACIÓN

- 5 **[0245]** Los siguientes ejemplos no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la invención tal y como se reivindica.

[0246] En la exposición experimental que se indica a continuación, se aplican las siguientes abreviaturas: IR (índice de rendimiento), ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μ g (microgramos); pg (picogramos); L (litros); ml y mL (mililitros); μ l y μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); U (unidades); V (voltios); MW (peso molecular); s (segundos); min (minuto/minutos); h (hora/horas); °C (grados centígrados); QS (cantidad suficiente); ND (no hecho); rpm (revoluciones por minuto); GH (grados de dureza alemana); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); bp (par de bases); kb (par de kilobase); kD (kilodaltons); ADNc (copia o ADN complementario); ADN (ácido desoxirribonucleico); ssDNA (ADN monocatenario); dsDNA (ADN bicatenario); dNTP (desoxirribonucleótido trifosfato); ARN (ácido ribonucleico); MgCl₂ (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro de sodio); p/v (peso-volumen); v/v (volumen-volumen); p/p (peso-peso); g (gravedad); OD (densidad óptica); ppm (partes por millón); solución tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS); SOC (2 % de bacto-triptona, 0,5 % de extracto de levadura de Bacto, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM); Caldo Terrific (TB; 12 g/l de bacto-triptona, 24 g/l de glicerol, 2,31 g/l de KH₂PO₄ y 12,54 g/l de K₂HPO₄); OD₂₈₀ (densidad óptica a 280 nm); OD₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm); A₄₀₅ (absorbancia a 405 nm); V_{max} (la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada por enzimas); PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida); PBS (solución salina tamponada con fosfato [NaCl 150 mM, tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2]); PBST (PBS + 0,25 % TWEEN®-20); PEG (polietilenglicol); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); RT-PCR (PCR de transcripción inversa); SDS (dodecilsulfato de sodio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[2-etanosulfónico]); HBS (solución salina tamponada con HEPES); Tris-HCl (tris(hidroximetil)aminometano-clorhidrato); Tricina (N-[tris(hidroximetil)-metil]-glicina); CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino) etanosulfónico); TAPS (ácido 3-[[tris(hidroximetil)-metil]-amino]-propanosulfónico); CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-propano-sulfónico); DMSO (dimetilsulfóxido); DTT (1,4-ditio-DL-treitol); SA (ácido sinapínico (s. ácido 5-dimetoxi-4-hidroxicinámico)); TCA (ácido tricloroacético); Glut y GSH (glutación reducido); GSSG (glutación oxidado); TCEP (Tris[2-carboxietil] fosfina); Ci (Curies); mCi (miliCuries); μ Ci (microCuries); HPLC (cromatografía líquida de alta presión); RP-HPLC (cromatografía líquida de alta presión en fase inversa); TLC (cromatografía en capa fina); MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo); Ts (tosyl); Bn (bencilo); Ph (fenilo); Ms (mesilo); Et (etilo), Me (metilo); *Taq* (ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*); Klenow (fragmento grande de ADN polimerasa I (Klenow)); EGTA (ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter) N, N, N', N'-tetraacético); EDTA (ácido etilendiaminotetracético); bla (gen de resistencia a la β -lactamasa o ampicilina); HDL (líquido de alta densidad); HDD (detergente en polvo de uso intensivo); HSG (detergente granulado de alta jabonadura); CEE (Europa central y oriental); EO (Europa Occidental); NA, cuando se usa CON referencia a detergentes (América del Norte); Japón y JPN, cuando se utilizan en referencia a detergentes (Japón); MJ Research (MJ Research, Reno, NV); Baseclear (Baseclear BV, Inc., Leiden, Países Bajos); PerSeptive (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA); ThermoFinnigan (ThermoFinnigan, San José, CA); Argo (Argo BioAnalytica, Morris Plains, NJ); Seitz EKS (SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemania); Pall (Pall Corp., East Hills, NY y Bad Kreuznach, Alemania); Spectrum (Spectrum Laboratories, Dominguez Rancho, CA); Molecular Structure (Molecular Structure Corp., Woodlands, TX); Accelrys (Accelrys, Inc., San Diego, CA); Chemical Computing (Chemical Computing Corp., Montreal, Canadá); New Brunswick (New Brunswick Scientific, Co., Edison, NJ); CFT (Center for Test Materials, Vlaardingen, Países Bajos); P&G y Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Irlanda); Finnzymes (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia); Kelco (CP Kelco, Wilmington, DE); Corning (Corning Life Sciences, Corning, Nueva York); (NEN (NEN Life Science Products, Boston, MA); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Noruega); Dynal (Dynal, Oslo, Noruega); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, TX); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY); Sigma (Sigma Chemical Co., San Louis, MO); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA); BD Biosciences y/o Clontech (BD Biosciences CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA); MWG Biotech (MWG Biotech, High Point, Carolina del Norte); Oligos Etc (Oligos Etc. Inc, Wilsonville, OR); Bachem (Bachem Bioscience, Inc., Rey de Prusia, PA); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI); Mediatech (Mediatech, Herndon, VA); Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY); Worthington (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); Millipore (Millipore, Billerica, MA); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japón); Roche (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza); EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA); Biondesign (Biondesign Intl., Saco, Maine); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, VA);

Sorvall (marca Sorvall, de Kendro Laboratory Products, Asheville, NC); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA); R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN); Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Suiza); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, Nueva York); Geneart (Geneart GmbH, Ratisbona, Alemania); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT);
 5 (Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey); PeptoTech (PeptoTech, Rocky Hill, NJ); SynPep (SynPep, Dublin, CA); New Objective (marca New Objective; Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, NJ); Waters (Waters, Inc., Milford, MA); Matrix Science (Matrix Science, Boston, MA); Dionex (Dionex, Corp., Sunnyvale, CA); Monsanto (Monsanto Co., St. Louis, MO); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Alemania); BASF (BASF Co., Florham Park, NJ); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT); Shell Chemicals (Shell
 10 Chemicals, Inc., Londres, Reino Unido); Stepan (Stepan, Northfield, IL); Clariant (Clariant, Sulzbach, Alemania); Industrial Zeolite (Industrial Zeolite Ltd., Grays, Essex, Reino Unido); Jungbunzlauer (Jungbunzlauer, Basilea, Suiza); Solvay (Solvay, Bruselas, Bélgica); 3V Sigma (3V Sigma, Bérgamo, Italia); Innospec (Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido); Thermphos (Thermphos, Vlissingen-Ost, Países Bajos); Ciba Specialty (Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza); Dow Corning (Dow Corning, Barry, Reino Unido); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, España); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, Países Bajos); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, MI); Mettler-Toledo (Mettler-Toledo Inc, Columbus, OH);
 15 RB (Reckitt-Benckiser, Slough, Reino Unido); y Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA).

[0247] Tal como se utiliza en el presente documento, en algunas listas, se indica un "0" al principio, con el fin de proporcionar una designación de tres números para cada sitio (p. ej., "001" es lo mismo que "1", por lo que "A001C" es lo mismo que "A1C"). En algunas listas, no se incluye el "0" inicial. Además, tal como se utiliza en el presente documento, "X" se refiere a cualquier aminoácido.
 20

[0248] En las composiciones detergentes de ejemplo proporcionadas en el presente documento, los niveles enzimáticos se expresan en enzima pura en peso de la composición total y, salvo que se especifique de otro modo, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales. Las identificaciones de componentes abreviadas en la presente memoria tienen los siguientes significados:
 25

Abreviatura	Ingrediente
LAS:	Alquilbencenosulfonato C ₁₁₋₁₃ lineal de sodio
NaC16-17HSAS:	Alquilsulfato C ₁₆₋₁₇ de sodio altamente soluble
TAS:	Alquilsulfato de sebo de sodio
CxyAS:	Alquilsulfato C _{1x} - C _{1y} de sodio
CxyEz:	Alcohol primario C _{1x} - C _{1y} predominantemente lineal condensado con una media de z moles de óxido de etileno.
CxyAEzS:	Alquilsulfato de sodio C _{1x} - C _{1y} condensado con una media de z moles de óxido de etileno. Nombre de molécula añadido en los ejemplos.
No iónico:	Alcohol graso etoxilado/propoxilado mixto; por ejemplo, Plurafac LF404, siendo un alcohol con un grado medio de etoxilación de 3,8 y un grado medio de propoxilación de 4,5.
QAS:	R ₂ .N+(CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH) con R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄ .
Silicato:	Silicato de sodio amorfo (ratio de SiO ₂ :Na ₂ O = 1,6-3,2:1).
Metasilicato:	Metasilicato de sodio (ratio de SiO ₂ :Na ₂ O = 1,0).
Zeolita A:	Aluminosilicato hidratado de fórmula Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ . 27H ₂ O
SKS-6:	Silicato laminar cristalino de fórmula δ-Na ₂ Si ₂ O ₅ .
Sulfato:	Sulfato sódico anhidro.
STPP:	Tripolifosfato de sodio.
MA/AA:	Copolímero aleatorio de acrilato/maleato 4:1, peso molecular medio de aproximadamente 70 000-80 000.
AA:	Polímero de poliacrilato de sodio de peso molecular medio de 4 500.
Policarboxilato:	Copolímero que comprende una mezcla de monómeros carboxilados como acrilato, maleato y metacrilato con un MW que oscila entre 2000-80 000 como Sokolan, comercializado por BASF, siendo un copolímero de ácido acrílico de MW 4500.
BB1:	Propano sulfonato de 3-(3,4-dihidroisoquinolinio)

Abreviatura	Ingrediente
BB2	1-(3,4-dihidroisoquinolinio)-decano-2-sulfato
PB1:	Perborato de sodio monohidratado
PB4:	Perborato de sodio tetrahidrato de fórmula nominal $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.
Percarbonato:	Percarbonato de sodio de fórmula nominal $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$.
TAED:	Tetraacetiletildiamina.
NOBS:	Nonanoiloxibencenosulfonato en forma de sal sódica.
DTPA:	Ácido dietilentriaminopentaacético
HEDP	ácido 1,1-hidroxietanodifosfónico.
DETPMP:	Penta(metilen)fosfonato de dietiltriamina (metileno), comercializado por Monsanto con el nombre comercial Dequest 2060.
EDDS:	Ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) en forma de su sal sódica.
Diamina:	Dimetilaminopropilamina; 1,6-hezanodiamina; 1,3-propanodiamina; 2-metil-1,5-pentanodiamina; 1,3-pentanodiamina; 1-metildiaminopropano.
DETBCHD	Dicloruro de 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6,6,2]hexadecano, sal de Mn(II).
PAAC:	Sal de pentaminacetato de cobalto (III).
Parafina:	Aceite de parafina vendido con el nombre comercial Winog 70 por Wintershall.
Sulfonato de parafina:	Un aceite o cera de parafina donde algunos de los átomos de hidrógeno se han reemplazado por grupos sulfonato.
Aldosa oxidasa:	Enzima oxidasa vendida con el nombre comercial Aldose Oxidase por Novozymes A/S
Galactosa oxidasa:	Galactosa oxidasa de Sigma.
nprE:	La forma recombinante de la enzima metalolipolítica neutra expresada en <i>Bacillus subtilis</i> (véase, p. ej., el documento WO 07/044993).
PMN:	Enzima metalolipolítica neutra purificada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .
Amilasa:	Una enzima amilolítica adecuada, como las vendidas con los nombres comerciales PURAFECT® Ox, descritas en WO 94/18314, WO96/05295 vendidas por Genencor; NATALASE®, TERMAMYL®, FUNGAMYI® y DURAMYL™, todas comercializadas por Novozymes A/S.
Lipasa:	Una enzima lipolítica adecuada, como las vendidas con los nombres comerciales LIPEX®, LIPOLASE®, LIPOLASE® Ultra de Novozymes A/S y Lipomax™ de Gist-Brocades
Celulasa:	Una enzima celulítica adecuada, como las vendidas con los nombres comerciales CAREZYME®, CELLUZYME® y/o ENDOLASE® de Novozymes A/S add ours.
Pectina liasa:	Una pectina liasa adecuada, como las vendidas con los nombres comerciales PECTAWAY® y PECTAWASH®, comercializadas por Novozymes A/S.
PVP:	Polivinilpirrolidona con un peso molecular medio de 60 000.
PVNO:	N-óxido de polivinilpiridina, con un peso molecular medio de 50 000.
PVPVI:	Copolímero de vinilimidazol y vinilpirrolidona, con un peso molecular medio de 20 000.
Abrrilantador 1:	4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenilo de disodio.
Antiespumante silicona:	de Regulador de espuma de polidimetilsiloxano con un copolímero de siloxano-oxialquileo como dispersante, con una relación de dicho regulador de espuma con respecto a dicho dispersante de 10:1 a 100:1.
Supresor jabonaduras:	de 12 % de silicona/sílice, 18 % de alcohol estearílico, 70 % de almidón en forma granulada.
SRP 1:	Poiésteres de extremo terminado aniómicamente.
PEG X:	Polietilenglicol de peso molecular x.

Abreviatura	Ingrediente
PVP K60®:	Homopolímero de vinilpirrolidona (MW medio 160 000)
Jeffamine ® ED-2001	Polietilenglicol con terminación, de Huntsman.
Isachem ® AS:	Alquilsulfato de alcohol ramificado de Enichem
MME PEG (2000):	Polietilenglicol monometil-éter (MW 2000), de Fluka Chemie AG.
DC3225C:	Supresor de jabonaduras de silicona, mezcla de aceite de silicona y sílice de Dow Corning.
TEPAE:	Etoxilato de tetraetilenpentaamina.
BTA:	Benzotriazol.
Betaína:	(CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ COO ⁻
Azúcar:	D-glucosa de calidad industrial o azúcar de calidad alimentaria
CFAA:	Alquilo C ₁₂ -C ₁₄ -N-metilglucamida
TPKFA:	Ácidos grasos de fracción completa descabezada C ₁₂ -C ₁₄ .
Arcilla:	Un silicato de aluminio hidratado en una fórmula general Al ₂ O ₃ SiO ₂ ·xH ₂ O. Tipos: Caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita.
pH:	Medido en solución al 1 % en agua destilada a 20 °C.

5 **[0249]** Para los detergentes de lavado de ropa líquidos de uso intensivo (HDL, por sus siglas en inglés) de Norteamérica (NA) y Europa Occidental (EO), la inactivación por calor de las enzimas presentes en detergentes comercializados se realiza poniendo detergente líquido medido previamente (en una botella de vidrio) en un baño de agua a 95 °C durante 2 horas. El tiempo de incubación para la inactivación por calor de los detergentes para lavar la vajilla de forma automática (ADW, por sus siglas en inglés) de NA y EO es de 8 horas. Tanto los detergentes calentados como los no calentados se someten a prueba a los 5 minutos tras la disolución del detergente para determinar de forma precisa el porcentaje desactivado. La actividad enzimática se analiza mediante el ensayo de AAPF.

10 **[0250]** Para someter a prueba la actividad enzimática en detergentes inactivados por calor, se elaboran soluciones de trabajo de detergentes a partir de soluciones madre inactivadas por calor. Se añaden cantidades apropiadas de dureza del agua (p. ej., 6 gpg o 12 gpg) y de tampón a las soluciones detergentes para cumplir con las condiciones deseadas. Las soluciones se mezclan mediante agitación vorticial o inversión de las botellas. La siguiente tabla proporciona información respecto a algunos de los detergentes disponibles en el mercado y condiciones de ensayo utilizados en el presente documento. En algunos experimentos, se pueden utilizar detergentes adicionales y/o
15 disponibles comercialmente en los siguientes ejemplos.

Tabla A. Condiciones de lavado de vajilla y de ropa							
Región	Forma	Dosis	Detergente*	Tampón	Gpg	pH	T (°C)
Lavado de ropa (granulado y líquido para uso intensivo)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	HEPES 5 mM	6	8,0	20
EO	HDL	5,0 g/L	Henkel PERSIL™	HEPES 5 mM	12	8,2	40
EO	HDG	8,0 g/L	P&G ARIEL®	2 mM de Na ₂ CO ₃	12	10,5	40
JPN	HDG	0,7 g/L	P&G TIDE®	2 mM de Na ₂ CO ₃	6	10,0	20
NA	HDG	1,0 g/L	P&G TIDE®	2 mM de Na ₂ CO ₃	6	10,0	20
Lavado de vajilla automático							
EO	ADW	3,0 g/L	RB CALGONIT™	2 mM de Na ₂ CO ₃	21	10,0	40
NA	ADW	3,0 g/L	P&G CASCADE®	2 mM de Na ₂ CO ₃	9	10,0	40

[0251] En algunos ejemplos adicionales, son de utilidad las siguientes soluciones:

Tabla B. Soluciones detergentes de trabajo

Detergente	Temp (°C)	Detergente (g/L)	pH	Tampón	Gpg
TIDE® 2X Cold	16	0,98	8	HEPES 5mM	6
TIDE® 2X Cold	32	0,98	8	HEPES 5mM	6
TIDE® 2X Cold	16	0,98	7	MOPS 5mM	6

En la tabla C, se proporcionan composiciones detergentes de lavado de ropa granuladas, adecuadas para el lavado de tejidos.

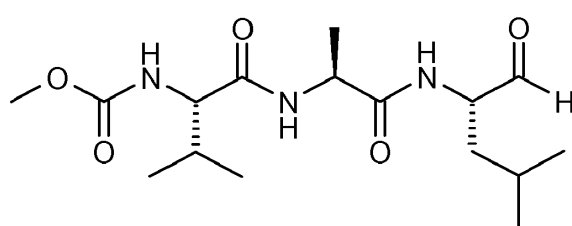
Tabla C. Composiciones detergentes para lavado de ropa granuladas y sus componentes						
Componente	Composiciones detergentes					
	1	2	3	4	5	6
Alquilbenzenosulfonato lineal con una longitud de cadena de carbono alifática C ₁₁ -C ₁₂	15	12	20	10	12	13
Otros tensioactivos	1,6	1,2	1,9	3,2	0,5	1,2
Mejorador(es) de fosfato	2	3	4			
Zeolita		1		1	4	1
Silicato	4	5	2	3	3	5
Carbonato de sodio	2	5	5	4	0	3
Poliacrilato (MW 4500)	1	0,6	1	1	1,5	1
Carboximetilcelulosa (Finnfix BDA de CPKelco)	1	-	0,3	-	1,1	-
Celluclean® (15,6 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Lipasa (20mg/g)	0,2		0,1		0,3	
Stainzyme Plus® (14 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Mannaway 4.0T (4 mg/g)	0,1			0,1		0,1
Blanqueador(es) fluorescente(s)	0,16	0,06	0,16	0,18	0,16	0,16
Ácido dietilentriaminopentaacético o ácido etilendiaminotetraacético	0,6		0,6	0,25	0,6	0,6
MgSO ₄	1	1	1	0,5	1	1
Blanqueador(es) y activador(es) de blanqueo	6,88		6,12	2,09	1,17	4,66
Colorante matificante de tiofeno etoxilado ⁵	0,002	0,001	0,003	0,003	-	-
Violeta directo 9 de Ciba Specialty Chemicals				0,0006	0,0004	0,0006
Sulfato/Ácido cítrico/Bicarbonato de sodio/Humedad/perfume	Resto hasta 100 %					

¹ Un copolímero de injertos aleatorios es un copolímero de óxido de polietileno con un injerto de acetato de polivinilo que presenta una cadena principal de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal de óxido de polietileno es de aproximadamente 6000 y la proporción de peso del óxido de polietileno en relación con el acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60, y no más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

² Polietilenimina (MW = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

³ Un polímero de limpieza de grasa alcoxilado anfílico es una polietilenimina (MW = 600) con 24 grupos etoxilados por -NH y 16 grupos propoxilados por -NH.

⁴ Inhibidor de enzima lipolítica reversible de estructura:

Tabla C. Composiciones detergentes para lavado de ropa granuladas y sus componentes						
Componente	Composiciones detergentes					
	1	2	3	4	5	6
						
⁵ Colorante matificante de tiofeno etoxilado tal como se describe en el documento US 7,208,459 B2.						

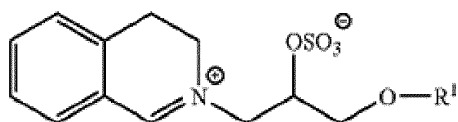
[0252] En la Tabla C, todos los niveles enzimáticos se expresan como un % de materia prima enzimática, excepto para la enzima lipolítica (de esta exposición), que se expresa como un % de proteína activa añadida al producto.

5 [0253] La Tabla D proporciona composiciones detergentes para lavado de ropa granuladas adecuadas para lavadoras automáticas de carga superior (composiciones detergentes 7-9) y para lavadoras de carga frontal (composiciones detergentes 10-11). La variante de enzima lipolítica analizada y/o la enzima lipolítica de la presente exposición se añade de manera separada a estas formulaciones de tal forma que la concentración final en la solución de lavado sea de entre 0,01 ppm y 10 ppm.

Tabla D. Composiciones detergentes para lavado de ropa granuladas y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	7	8	9	10	11
Tensioactivos					
Alquilsulfato C ₁₆₋₁₇ ramificado	3,55	15,8			
Alquilsulfato C ₁₂₋₁₄			1,5		
Alquilbenzenosulfonato de sodio lineal con una longitud de cadena alifática C _{11-C12}	9,6		10,6	7,5	9
Alcohol etoxi C _{14/15} -3-sulfato de sodio	1,15			2,88	
Alquilsulfato C _{14/15} de sodio	2,37				
Alcoholetoxilato C _{14/15} con una media de 7 moles de etoxilación				1,17	1
Cloruro de amonio cuaternario mono-hidroxietil dimetil-alquilo C ₈₋₁₀					0,45
Cloruro de di-metil-hidroxietil-lauril-amonio			0,18		
Zeolita A	13,9	4,7	0,01	2,9	1,8
Silicato de sodio a una relación de 1,6	4	0,2		4	4
Silicato de sodio a una relación de 2,35			8		
Ácido cítrico				2,5	1,4
Tripolifosfato de sodio			5		
Carbonato de sodio	24,1	30	16,9	24,4	21
Nonanoiloxibenzenosulfonato	5,78	2,81	0,96		
Potenciador del blanqueo a base de oxaziridinio				0,03	0,017
S,S,-etilendiaminodisuccinato de tetrasodio				0,2	
Sal heptasódica del ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)	0,61				0,33

Tabla D. Composiciones detergentes para lavado de ropa granuladas y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	7	8	9	10	11
Ácido hidroxietanodimetilfosfónico				0,29	0,45
Tetraacetato de etilendiamina			0,27		
MgSO ₄			0,47	0,5994	0,782
Percarbonato de sodio	7	4,4		15,9	19,1
Tetraacetiletilenodiamina				3,3	4,6
Perborato de sodio monohidrato			1,2		
Carboximetilcelulosa (p. ej., Finnfix BDA de CPKelco)	0,1		0,17	1,69	0,23
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico de sodio (70/30)	0,0236	3,8		2	2,5
Poliacrilato de sodio (Sokalan PA30 CL)	4		0,84		
Polímero de tereftalato				0,23	
Copolímero de injerto aleatorio de acetato de vinilo/polietilenglicol			0,89	0,89	0,91
Fotoblanqueador (tetrasulfonato de ftalocianina de zinc)			0,005	0,001	0,002
Blanqueador fluorescente C.I. 260	0,11	0,15	0,04	0,23	0,15
Blanqueador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)			0,1		
Granulado de supresor de jabonaduras		0,25		0,07	0,04
Carboximetilcelulosa modificada hidrofóticamente (Finnifix ® SH-1)			0,019	0,028	
Bentonita			8,35		
Misceláneo (Colorantes, perfumes, coadyuvante tecnológico, humedad y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

- [0254]** En la Tabla D, los ingredientes tensioactivos pueden obtenerse de cualquier proveedor adecuado, incluyendo, pero sin carácter limitativo, BASF (p.ej., LUTENSOL®), Shell Chemicals, Stepan, Huntsman y Clariant (p. ej., PRAEPAGEN®). Puede obtenerse zeolita de fuentes como Industrial Zeolite. Puede obtenerse ácido cítrico y citrato de sodio de fuentes como Jungbunzlauer. Puede obtenerse percarbonato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y sesquicarbonato de sodio de fuentes como Solvay. Pueden obtenerse copolímeros de maleato/acrilato de fuentes como BASF. Puede obtenerse carboximetilcelulosa y carboximetilcelulosa modificada hidrofóticamente de fuentes como CPKelco. Puede obtenerse blanqueador fluorescente C.I. 260 de 3V Sigma (p. ej., OPTIBLANC®, OPTIBLANC® 2M/G, OPTIBLANC® 2MG/LT Extra u OPTIBLANC® Ecobright). Puede obtenerse el S,S,-etilendiaminodisuccinato de tetrasodio de fuentes como Innospec. Puede obtenerse el copolímero de tereftalato de Clariant (p. ej., REPELOTEX SF 2). Además, puede obtenerse ácido 1-Hidroxietano-1,1-difosfónico de Thermphos. El potenciador del blanqueo basado en oxaziridinio presenta la siguiente estructura, donde R¹ = 2-butiloxilo, y se produjo conforme al documento US 2006/0089284A1.



- [0255]** Pueden obtenerse las enzimas NATALASE®, TERMAMYL®, STAINZYME PLUS®, CELLUCLEAN® y MANNAWAY® de Novozymes. Puede obtenerse el tetrasulfonato de ftalocianina de zinc de Ciba Specialty Chemicals (p. ej., TINOLUX® BMC). Puede obtenerse el granulado de supresor de jabonaduras de Dow Corning. En estas composiciones detergentes, un copolímero de injertos aleatorios es un copolímero de óxido de polietileno con injertos de acetato de polivinilo que presenta una cadena principal de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal de óxido de polietileno es de 6000 y la proporción del peso de óxido de polietileno en relación con el acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60, y no más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

[0256] Las Tablas E-G proporcionan composiciones detergentes granuladas adicionales adecuadas para lavadoras (detergentes 36a-n). La variante de enzima lipolítica GG36 analizada o la enzima lipolítica de agua fría de la presente exposición se añade de manera separada a estas formulaciones.

Tabla E. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36a	36b	36c	36d	36e
Tensioactivos					
No iónico C ₁₀				0,1843	
Alquilsulfato C ₁₆₋₁₇ ramificado	3,53	3,53	3,53		
Alquilsulfato C ₁₂₋₁₄					
Alquilbenzenosulfonato de sodio lineal con una longitud de cadena alifática C _{11-C12}	8,98	8,98	8,98	13,58	14,75
Alcohol etoxi C _{14/15} -3-sulfato de sodio	1,28	1,28	1,28		
Alquilsulfato C _{14/15} de sodio	2,36	2,36	2,36		
Alcoholetoxilato C _{14/15} con una media de 7 moles de etoxilación					
Cloruro de amonio cuaternario mono-hidroxietyl dimetil-alquilo mono-C ₈₋₁₀					
Cloruro de di-metil-hidroxietyl-lauril-amonio				0,1803	
Zeolita A	15,31	15,31	15,31		4,47
Bentonita				8,35	
Silicato de sodio a una relación de 1,6					0,16
Silicato de sodio a una relación de 2,0	3,72	3,72	3,72	8,41	
Silicato de sodio a una relación de 2,35					
Ácido cítrico				0,0066	
Tripolifosfato de sodio				5,06	
Carbonato de sodio	26,1	26,18	26,1	15,9	29,0
Nonanoiloxibenzenosulfonato	5,78	5,78	5,78	1,17	1,86
Potenciador del blanqueo a base de oxaziridinio	0,037	0,037	0,037		
S, S,-etilendiaminodisuccinato de tetrasodio					
Sal heptasódica del ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)	0,62	0,62	0,62		
Ácido hidroxietanodimetilenfosfónico					
Tetraacetato de etilendiamina				0,2701	
MgSO ₄	0,056	0,056	0,056	0,47	
Percarbonato de sodio		7,06	7,06		3,64
Tetraacetiletlenodiamina					
Perborato de sodio monohidrato				1,47	
Carboximetilcelulosa (p. ej., Finfix BDA de CPKelco)	0,38	0,38	0,38	0,173	
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico de sodio (70/30)	3,79	3,78	3,79		3,64
Poliacrilato de sodio (Sokalan PA30 CL)	3,78	3,78	3,78	0,842	

Tabla E. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36a	36b	36c	36d	36e
Polímero de tereftalato					
Copolímero de injerto aleatorio de acetato de vinilo/polietilenglicol				0,89	
Fotoblanqueador (tetrasulfonato de ftalocianina de zinc)					
Blanqueador fluorescente C.I. 260	0,1125	0,1125	0,1125	0,043	0,15
Blanqueador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)				0,0952	
Granulado de supresor de jabonaduras	0,015	0,015	0,015		0,031
Carboximetilcelulosa modificada hidrofóbicamente (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Misceláneo (Colorantes, perfumes, coadyuvante tecnológico, humedad y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Tabla F. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36f	36g	36h	36i	36j
Tensioactivos					
No iónico C ₁₀	0,1142	0,2894	0,1885	0,1846	0,1885
Alquilsulfato C ₁₆₋₁₇ ramificado					
Alquilsulfato C ₁₂₋₁₄					
Alquilbenzenosulfonato de sodio lineal con una longitud de cadena alifática C _{11-C₁₂}	12,94	15,69	9,01	8,42	9,51
Alcohol etoxi C _{14/15} -3-sulfato de sodio					
Alquilsulfato C _{14/15} de sodio					
Alcoholetoxilato C _{12/14} con una media de 7 moles de etoxilación	2,9				
Alcoholetoxilato C _{12/14} con una media de 3 moles de etoxilación				2,44	
Alcoholetoxilato C _{14/15} con una media de 7 moles de etoxilación			0,97	1,17	0,97
Cloruro de amonio cuaternario mono-hidroxietil dimetil-alquilo mono-C ₈₋₁₀			0,45		
Cloruro de di-metil-hidroxietil-lauril-amonio		0,195			0,45
Zeolita A	2,01	0,39	1,83	2,58	0,59
Silicato de sodio a una relación de 1,6			4,53	5,62	4,53
Silicato de sodio a una relación de 2,0		10,1			
Silicato de sodio a una relación de 2,35	7,05				
Ácido cítrico			1,4	1,84	1,0
Tripolifosfato de sodio		5,73			

Tabla F. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36f	36g	36h	36i	36j
Tensioactivos					
Carbonato de sodio	12,65	15,93	21,0	27,31	20,2
Nonanoiloxibenzenosulfonato		1,73			
Potenciador del blanqueo a base de oxaziridino			0,0168	0,0333	0,024
S,S,-etilendiaminodisuccinato de tetrasodio					
Sal heptasódica del ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)			0,327		0,3272
Ácido hidroxietanodimetilenfosfónico			0,45	0,2911	0,45
Tetraacetato de etilendiamina		0,28		0,1957	
MgSO ₄		0,54	0,79	0,6494	0,793
Percarbonato de sodio			19,1	15,85	22,5
Tetraacetiletlenodiamina			4,554	3,71	5,24
Perborato de sodio monohidrato		5,55			
Carboximetilcelulosa (p. ej., Finnfix BDA de CPKelco)	0,62	0,21	0,23	1,07	0,2622
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico de sodio (70/30)	0,40	2,61	2,5	2,00	1,75
Poliacrilato de sodio (Sokalan PA30 CL)			0,0055	0,011	0,008
Polímero de tereftalato				0,231	
Copolímero de injerto aleatorio de acetato de vinilo/polietilenglicol	0,55	1,40	0,911	0,8924	0,911
Fotoblanqueador (tetrasulfonato de ftalocianina de zinc)					
Blanqueador fluorescente C.I. 260	0,1174	0,048	0,1455	0,2252	0,1455
Blanqueador fluorescente C.I. 351 (Tinopal @ CBS)		0,1049			
Granulado de supresor de jabonaduras			0,04	0,0658	0,04
Carboximetilcelulosa modificada hidrofóticamente (Finnifix @ SH-1)					
Bentonita					
Misceláneo (Colorantes, perfumes, coadyuvante tecnológico, humedad y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Tabla G. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36k	36l	36m	36n	
Tensioactivos					
No iónico C ₁₀	0,1979	0,1979	0,1979	0,1979	
Alquilsulfato C ₁₆₋₁₇ ramificado					
Alquilsulfato C ₁₂₋₁₄					
Alquilbenzenosulfonato de sodio lineal con una longitud de cadena alifática C ₁₁ -C ₁₂	8,92	8,92	11,5	11,5	

Tabla G. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36k	36l	36m	36n	
Tensioactivos					
Alcohol etoxi C _{14/15} -3-sulfato de sodio	1,62	1,62	1,125	1,125	
Alquilsulfato C _{14/15} de sodio					
Alcoholtoxilato C _{14/15} con una media de 7 moles de etoxilación	1,0	1,0	1,5	1,5	
Cloruro de amonio cuaternario mono-hidroxietil dimetil-alquilo mono-C ₈₋₁₀					
Cloruro de di-metil-hidroxietil-lauril-amonio					
Zeolita A	1,63	1,63	2,0	2,0	
Silicato de sodio a una relación de 1,6	4,75	4,75	4,75	4,75	
Silicato de sodio a una relación de 2,0			0,06	0,06	
Silicato de sodio a una relación de 2,35					
Ácido cítrico	1,10	1,10	1,1	1,1	
Tripolifosfato de sodio					
Carbonato de sodio	23,3	23,3	23,3	23,3	
Nonanoiloxibenzenosulfonato					
Potenciador del blanqueo a base de oxaziridinio	0,021	0,021	0,015	0,015	
S, S,-etilendiaminodisuccinato de tetrasodio	0,26	0,26	0,26	0,26	
Sal heptasódica del ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)					
Ácido hidroxietanodimetilenfosfónico	0,47	0,47	0,47	0,47	
Tetraacetato de etilendiamina					
MgSO ₄	0,83	0,83	0,82	0,82	
Percarbonato de sodio	19,35	19,35	19,35	19,35	
Tetraacetiletilenodiamina	4,51	4,51	4,51	4,51	
Perborato de sodio monohidrato					
Carboximetilcelulosa (p. ej., Finnfix BDA de CPKelco)	1,01	1,01	1,01	1,01	
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico de sodio (70/30)	1,84	1,84	1,84	1,84	
Poliacrilato de sodio (Sokalan PA30 CL)	0,007	0,007	0,005	0,005	
Polímero de tereftalato	0,179	0,179	0,179	0,179	
Copolímero de injerto aleatorio de acetato de vinilo/polietilenglicol	0,96	0,96	0,96	0,96	
Fotoblanqueador (tetrasulfonato de ftalocianina de zinc)					
Blanqueador fluorescente C.I. 260	0,153	0,153	0,171	0,171	
Blanqueador fluorescente C.I. 351 (Tinopal © CBS)					
Granulado de supresor de jabonaduras	0,042	0,042	0,042	0,042	
Carboximetilcelulosa modificada hidrofóticamente (Finnifix © SH-1)					

Tabla G. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36k	36l	36m	36n	
Tensioactivos					
Bentonita					
Misceláneo (Colorantes, perfumes, coadyuvante tecnológico, humedad y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

[0257] Notas para las composiciones detergentes 36a-n de las tablas E, F y G:

[0258] Los ingredientes tensioactivos pueden obtenerse de BASF, Ludwigshafen, Alemania (Lutensol®); Shell Chemicals, Londres, Reino Unido; Stepan, Northfield, Illinois, EE. UU.; Huntsman, Huntsman, Salt Lake City, Utah, EE. UU.; Clariant, Sulzbach, Alemania (Praepagen®).

5 [0259] La zeolita puede obtenerse de Industrial Zeolite (UK) Ltd, Grays, Essex, Reino Unido.

[0260] El ácido cítrico y el citrato de sodio pueden obtenerse de Jungbunzlauer, Basilea, Suiza.

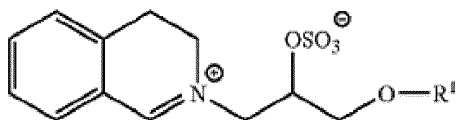
[0261] El percarbonato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y sesquicarbonato de sodio pueden obtenerse de Solvay, Bruselas, Bélgica.

10 [0262] Los copolímeros de acrilato/maleato pueden obtenerse de BASF, Ludwigshafen, Alemania. La carboximetilcelulosa y la carboximetilcelulosa modificada hidrofólicamente pueden obtenerse de CPKelco, Arnhem, Países Bajos.

[0263] El blanqueador fluorescente C.I. 260 puede obtenerse de 3V Sigma, Bérgamo, Italia, como Optiblanc® Optiblanc® 2M/G, Optiblanc® 2MG/LT Extra, u Optiblanc® Ecobright.

15 [0264] El S,S,-etilendiaminodisuccinato de tetrasodio puede obtenerse de Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido. El copolímero de tereftalato puede obtenerse de Clariant, bajo el nombre comercial de Repelotex SF 2. El ácido 1-Hidroxietano-1,1-difosfónico puede obtenerse de Termphos, Vlissingen-Oost, Países Bajos.

[0265] El potenciador del blanqueo basado en oxaziridinio presenta la siguiente estructura, donde R1 = 2-butilolcilo, y se produjo conforme al documento US 2006/0089284A1.



20 [0266] Las enzimas Natalase®, Termamyl®, Stainzyme Plus®, Celluclean® y Mannaway® pueden obtenerse de Novozymes, Bagsværd, Dinamarca.

[0267] El tetrasulfonato de ftalocianina de zinc puede obtenerse de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza, como Tinolux® BMC.

[0268] El granulado de supresor de jabonaduras puede obtenerse de Dow Corning, Barry, Reino Unido.

25 [0269] El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de óxido de polietileno con un injerto de acetato de polivinilo que presenta una cadena principal de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal de óxido de polietileno es de 6000 y la proporción del peso del óxido de polietileno en relación con el acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60, y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

30 EJEMPLO 1

Métodos

[0270] Los siguientes ensayos son ensayos estándar utilizados en los ejemplos descritos a continuación. En ocasiones, determinados protocolos específicos exigen desviaciones de estos ensayos estándar. En dichos casos, las desviaciones de estos protocolos de ensayo estándar que se describen a continuación se identifican en los ejemplos.

35

A. Índice de rendimiento

[0271] El índice de rendimiento (IR) de una enzima compara el rendimiento de la variante (valor medido) y el de la enzima estándar (valor teórico o valor medido) con la misma concentración de proteínas. Además, se pueden calcular los valores teóricos por medio de los parámetros de la ecuación de Langmuir de la enzima estándar.

[0272] Un índice de rendimiento (IR) superior a 1 (IR>1) indica un rendimiento mejorado de una variante en comparación con la estándar (p. ej., TLL, SEQ ID NO:2) mientras que un IR de 1 (IR=1) identifica una variante con el mismo rendimiento que la estándar, y un IR inferior a 1 (IR<1) identifica una variante con un peor rendimiento que la estándar.

5 B. Hidrólisis de ensayo de ésteres de *p*-nitrofenilo

[0273] Las variantes de TLL se analizan para observar la actividad de lipasa en tres sustratos de éster de para-nitrofenilo (pNP) de diversas longitudes de cadena alquilo para determinar la preferencia de longitud de cadena de las variantes de TLL. En la tabla 1-1, se proporcionan detalles de los sustratos de éster de pNP.

Tabla 1-1 Sustratos de éster de pNP			
Sustrato:	Abr.	Longitud de cadena	Fuente
butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	pNPB	C4	Sigma (CAS 2635-84-9)
caprilato (octanoato) de <i>p</i> -nitrofenilo	pNPO	C8	Fluka (CAS 1956-10-1)
palmitato de <i>p</i> -nitrofenilo	pNPP	C16	Sigma (CAS 1492-30-4)

10 **[0274]** Se prepara una emulsión de reacción con sustratos de éster de pNP usando éster de pNP 0,8 mM presuspendido en etanol (5 %) en HEPES 0,05 M ajustado a pH 8,2 o en MES 0,05 M ajustado a pH 6,0.

15 **[0275]** Las suspensiones de éster de pNP/tampón se mezclan y se transfieren a una placa de microtitulación (MTP) de 96 pocillos que contiene la muestra de enzima, en un volumen total de 200 µl. La dilución de las muestras de enzima y sus volúmenes de transferencia se ajustan para mantener la reacción dentro de un rango lineal. La generación de pNP liberado se controla durante un período de 3 minutos a una DO₄₀₅ nm y se corrige usando valores en blanco (sin enzima). El producto de pNP generado por segundo se calcula usando una curva estándar de pNP y luego se normaliza a la muestra de enzima añadida en el pocillo (µmol de pNP/s por mg de enzima añadida). Cuando se utiliza el caprilato de *p*-nitrofenilo a pH 6,0, las suspensiones de éster de pNP/tampón se mezclan y se transfieren a una placa de microtitulación (MTP) de 96 pocillos que contiene la muestra de enzima, en un volumen total de 150 µl. Las placas se cierran y se agitan durante 10 minutos a 900 rpm a 25 °C en un agitador iEMS (Thermo scientific). Después de la incubación, se añaden 50 µl de HEPES 0,2 M pH 8,2 que incluye tritón X-100 0,5 %. La generación de pNP liberado se lee a una DO₄₀₅ nm y se corrige usando valores en blanco (sin enzima).

25 **[0276]** El índice de rendimiento de la hidrólisis se determina mediante la comparación de la hidrólisis de la variante de enzima en un sustrato de éster de pNP particular con la de la enzima de TLL (SEQ ID NO: 2).

C. Ensayo de estabilidad del detergente

[0277] La estabilidad del detergente acelerada de las variantes de TLL se controla sometiendo a las variantes a estrés en una solución al 10 % (v/v) del detergente líquido de uso intensivo (HDL) conocido comercialmente como líquido de agua fría Tide (P&G, EE. UU; con tratamiento de calor) a una temperatura elevada.

30 **[0278]** El fermento crudo de las lipasas se diluye 50x con una solución al 10 % (v/v) de líquido de agua fría Tide en una placa de PCR de 96 pocillos. Después de la mezcla, se transfieren 7,5 µl a pocillos de una placa de 96 pocillos que contiene 192,5 µl de sustrato de octanoato de pNP y se mide la actividad como se describe en B para generar el valor sin estrés.

35 **[0279]** La placa de PCR se cierra y se incuba en una máquina de PCR durante 30 min a 41 °C. Una vez finalizada la incubación, la placa se enfría durante 3 minutos a 4 °C antes de volver a medir la actividad. La actividad de las variantes de enzimas se determina mediante la transferencia de 15 µl de las mezclas incubadas a una placa de 96 pocillos que contiene 185 µl de suspensión de octanoato de pNP/tampón, y la actividad se mide como se describe en la sección B para generar el valor sometido a estrés.

40 **[0280]** El índice de rendimiento de estabilidad del detergente se determina mediante la comparación de la relación de actividad del valor sometido a estrés y sin estrés para la variante de enzima con la de la enzima de TLL SEQ ID NO: 2).

D. Ensayo de termoestabilidad

45 **[0281]** La termoestabilidad acelerada de las variantes de TLL se controla sometiendo a las variantes a estrés en HEPES 50 mM, pH 8,2, con 1 ppm de proteasa de subtilisina BPN'-Y217L a una temperatura elevada. Se transfieren 80 µl de HEPES 50 mM, pH 8,2 con proteasa a unos pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos que contiene 20 µl de la muestra de enzima. Después de la mezcla, la actividad de las variantes de enzimas se determina transfiriendo 2 µl de las mezclas de tampón/lipasa a una placa de 96 pocillos que contiene 198 µl de octanoato de pNP/suspensión de tampón, y la actividad se mide como se describe en la sección B.

[0282] La placa de PCR se cierra y se incuba en una máquina de PCR durante 30 min a 64 °C. Después de la incubación, la placa se enfría a 4 °C durante 3 min antes de medir la actividad. La actividad de las variantes de enzimas se determina mediante la transferencia de 4 µl de las mezclas incubadas a una placa de 96 pocillos que contiene 196 µl de octanoato de pNP/suspensión de tampón, y la actividad se mide como se describe en la sección B.

[0283] Se calcula una relación de actividad de termoestabilidad a partir de la actividad enzimática después del calentamiento, dividida por la actividad enzimática antes del calentamiento, y se expresa como el porcentaje de actividad restante. El índice de rendimiento de la termoestabilidad acelerada se determina mediante la comparación de la relación de actividad de la variante de enzima con el de la enzima de TLL tratada de manera similar (SEQ ID NO: 2).

D. Ensayo de estabilidad de LAS

[0284] La estabilidad de LAS (sulfonato de alquilbenceno lineal, concretamente dodecilbencenosulfonato de sodio, Sigma Cat. n.º 289957) acelerada de las variantes de TLL se controla sometiendo las variantes a estrés en LAS al 0,1 % diluido en tampón HEPES, pH 8.

[0285] Se transfieren 80 µl de LAS al 0,1 % (p/v) a pH 8,2 a una placa de PCR de 96 pocillos que contiene 20 µl de la muestra de enzima. Después de la mezcla, la actividad de las variantes de enzimas se determina transfiriendo 2 µl de las mezclas de tampón/lipasa a una placa de 96 pocillos que contiene 198 µl de octanoato de pNP/suspensión de tampón, y la actividad se mide como se describe en la sección B.

[0286] La placa de PCR se cierra y se incuba en una máquina de PCR durante 30 min a 25°C. Después de la incubación, la placa se enfría a 4 °C durante 3 min antes de medir la actividad. La actividad de las variantes de enzimas se determina mediante la transferencia de 4 µl de las mezclas incubadas a una placa de 96 pocillos que contiene 196 µl de octanoato de pNP/suspensión de tampón, y la actividad se mide como se describe en la sección B.

[0287] Una relación de actividad de estabilidad de LAS se calcula basándose en la actividad enzimática después de la incubación en LAS, dividida por la actividad enzimática en ausencia de LAS, y se expresa como porcentaje de actividad restante. El índice de rendimiento para la estabilidad de LAS se determina comparando la relación de actividad de la enzima variante con la de la enzima de TLL tratada de forma similar SEQ ID NO: 2).

E. Ensayo de micromuestras CS-61

[0288] El rendimiento de limpieza de las variantes de lipasa se analiza en un ensayo de micromuestras. Las muestras CS-61, que son muestras de algodón previamente teñidas, teñidas con grasa de vaca y un tinte rojo (Center for Testmaterial, CFT, Países Bajos) se utilizan en un formato de placa de 96 pocillos. Las muestras se cortan en trozos de 5 mm de diámetro y se colocan en cada pocillo de la MTP. El rendimiento de las variantes de lipasa se prueba en tres fondos de detergente; dosis completa de líquido de agua fría Tide (tratado térmicamente durante tres horas a 95 °C, dosis final: 0,92 g/l), media dosis de líquido de agua fría Tide (tratado térmicamente durante tres horas a 95 °C, dosis final: 0,46 g/l) y media dosis de líquido de agua fría Tide (tratado térmicamente durante tres horas a 95 °C), más adyuvante (n-dodecil-β-D-maltopiranosido) (dosis final de detergente: 0,46g/L, adyuvante: 0,272 µM).

[0289] Las muestras de variantes de lipasa para su análisis se obtienen de caldo de cultivo filtrado de Millipore de cultivos cultivados en placas MTP. Los tampones utilizados son HEPES 20 mM (concentración final), pH 8,2, y la dureza del agua se ajusta a 6gpg 2:1 Ca:Mg.

[0290] Se añade un volumen de 247,5 µl de la solución de detergente HDL (descrita anteriormente) a cada pocillo que contiene muestra de la placa de 96 pocillos. Para iniciar la reacción, se añaden muestras de enzima a un volumen de 3,5 L en cada pocillo. Las placas se cierran y se agitan durante 30 minutos a 900 rpm a 30 °C en un agitador iEMS (Thermo scientific). Tras la incubación, se enjuagan los tejidos 3 veces con agua desionizada mediante el uso de una lavadora de placas Hydrospeed (Tecan, Austria) y se dejan secar a 50 °C durante la noche. La eliminación de manchas se cuantifica mediante mediciones RGB de los tejidos enjuagados y secos, tomadas con un escáner (MiCrotek Scan Maker 900). Las imágenes se importan a Photoshop CSII, donde los valores RGB se extraen de la muestra que contiene áreas mediante la utilización de IPTK 5.0 de Reindeer Graphics. Los valores porcentuales de eliminación de suciedad (SRI, por sus siglas en inglés) del tejido lavado se calculan en relación con los tejidos sin lavar utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de eliminación de suciedad (SRI)} = (\Delta E / \Delta E_{\text{inicial}}) * 100$$

Donde

$$\Delta E = \sqrt{(R_{\text{antes}} - R_{\text{después}})^2 + (G_{\text{antes}} - G_{\text{después}})^2 + (B_{\text{antes}} - B_{\text{después}})^2}$$

Donde

$$\Delta E_{\text{inicial}} = \sqrt{(R_{\text{blanco}} - R_{\text{después}})^2 + (G_{\text{blanco}} - G_{\text{después}})^2 + (B_{\text{blanco}} - B_{\text{después}})^2}$$

[0291] El índice de rendimiento para el rendimiento de limpieza se calcula comparando el SRI de la variante de enzima con el SRI de la enzima estándar de TLL (SEQ ID NO: 2) con la misma dosis de enzima que la variante. Se utiliza un ajuste de Langmuir para calcular cuál sería el SRI para la TLL con la misma dosis de enzima que la variante.

F. Detergentes

[0292] Se utiliza un detergente disponible en el mercado:

Líquido de agua fría Tide (P&G). Adquirido comercialmente en agosto de 2010 y tratado con calor (tres horas a 95 °C) para inactivar las enzimas en la formulación de producto.

G. Ensayo de determinación de proteínas

[0293] La concentración de proteína de las variantes de TLL se determina para el caldo de fermento filtrado de cultivos cultivados en placas MTP usando un inmunoensayo de transferencia de excitación fluorescente. El antígeno de TLL marcado con fluoresceína se mezcla con un anticuerpo de conejo anti-TLL marcado con rodamina con una relación antígeno-anticuerpo en la que se apaga la emisión de fluoresceína. Cuando se agrega a la mezcla, la proteína variante de TLL competirá por unirse al anticuerpo anti-TLL marcado, lo que provocará un aumento en la emisión de fluoresceína. El aumento de la emisión de fluoresceína es directamente proporcional a la concentración de proteína variante de TLL.

[0294] Se transfieren 20 µl de caldo de fermento filtrado de variante de TLL a una placa negra de 96 pocillos de fondo plano que contiene 140 µl de solución salina tamponada con fosfato y se mezcla. A continuación, se transfieren a la placa 20 µl de cada TLL marcada con fluoresceína y de anticuerpo de conejo anti-TLL marcado con rodamina y se mezclan. Después de 30 minutos de incubación a oscuras a temperatura ambiente, se mide la fluorescencia de cada pocillo usando una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Se usó un ajuste lineal de emisión de fluoresceína para estándares de enzima de TLL (SEQ ID NO: 2) para determinar la concentración de proteína de cada variante de TLL.

Ejemplo 2

Clonación y expresión en *Bacillus subtilis* de lipasa-3 de *Thermomyces lanuginosus*

[0295] La lipasa-3 de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) corresponde a la familia abH23.01, de tipo lipasa *Rhizomucor mihei* (Lipase Engineering Database, www.led.uni-stuttgart.de) con la secuencia de aminoácidos de la lipasa madura establecida como PDB: 1DT3.

[0296] Un gen sintético de TLL (SEQ ID NO: 1) fue diseñado para su expresión en *B. subtilis* basándose en la secuencia de aminoácidos de TLL. El gen de TLL fue subclonado en un vector de expresión de *Bacillus* basado en pBN de replicación como un fragmento BmtI-HindIII, que contiene el promotor *aprE*, la secuencia de señales de *aprE* y el terminador del gen de subtilisina BPN' (*B. Amylolyquefaciens*) Babé *et al.* (1998), Biotechnol. Appl. Biochem. 27: 117-124). La ligación de este vector con el gen sintético dio como resultado la fusión del extremo N-terminal del polipéptido de TLL con el tercer aminoácido del propéptido AprE de *B. subtilis* codificado por el vector de expresión (en el vector basado en pBN, el aminoácido -2 en el péptido señal fue previamente mutagenizado para introducir el sitio BmtI). Tras la escisión de la peptidasa señal natural en el huésped, la proteína de TLL recombinante producida de esta manera tiene tres aminoácidos adicionales (Ala-Gly-Lys) en su término amino. El sitio de escisión de señal predicho fue determinado por el programa Signal P 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), establecido en el sistema SignalP-NN, (Emanuelsson *et al.*, (2007), Nature Protocols, 2: 953-971).

[0297] Para la expresión del gen de TLL en *B. subtilis*, un vector basado en pHY300PLK (Takara) fue utilizado con un terminador transcripcional introducido después del gen de tetraciclina mediante la ligación de un casete de oligonucleótido

GTTACCTTGAATGTATATAAACATTCTCAAAGGGATTTCTAATAAAAAACGCTCGGTTGCCG (5'-
 CCGGGCGTTTTTATGCATCGATGG hibridado con 5'-
 AATTCCATCGATGCATAAAAAACGCCGCGGCAACCGAGCGTTTTTTATTAGAAATCCCTT
 TGAGAAATGTTTATACATTCAAG) en los sitios BstEII y EcoRI de un vector a base de pHY300PLK.

[0298] A continuación, el casete de expresión de TLL completo del vector basado en pBN se clonó como un fragmento EcoRI-BamHI en los sitios EcoRI y HindIII de este vector basado en pHY300PLK usando un conector BamHI-HindIII (5-GATCCTGACTGCCTG hibridado con 5'-AGCTCAGGCAGTCAG) que, después de la clonación, elimina el sitio HindIII original en el vector basado en pHY300PLK. El vector resultante se denominó pHYT-TLLwt (figura 2-1).

SEQ ID NO: 1 establece la secuencia nucleotídica del gen de TLL sintético

GCTAGCGCAGCTGGCAAAGAAGTTAGCCAAGATCTGTTCAACCAATTCAACCTTTTCGCTCA
 ATACTCTGCAGCTGCTTACTGCGGAAAGAACAACGATGCACCTGCTGGTACTAACATCACTT
 GCACAGGTAACGCATGTCCTGAAGTAGAAAAAGCTGATGCTACATTTCTTTACTCTTTTGAA
 GATAGCGGCGTGGCGATGTTACCGGTTTCTTAGCTCTGGATAACACAAAACAACTTATCGT
 CCTTAGCTTCAGAGGCTCTCGCTCAATCGAAAAGTGGATCGGTAACCTTAATTTTGACTTGA
 AAGAAATCAACGATATCTGCTCTGGTTGCCGTGGCCATGACGGATTACATCATCTTGGAGA
 AGCGTCGCAGACACGCTTCGCCAAAAAGTAGAAGATGCCGTACGCGAACACCCAGATTACA
 GAGTAGTTTTACAGGTCACTCTTTGGCGGAGCTTTAGCAACAGTAGCAGGCGCTGATCTC
 CGCGGTAACGGATACGACATTGATGTCTTCTTTACGGCGCTCCGCGCGTGGTAACAGAGC
 GTTTGCTGAATTTTAACTGTACAAACAGGCGGAACTCTTTATCGCATCACTCACACAAACG
 ATATTGTCCCGCGCTTACCTCCGAGAGAATTTGGTTACTCACACAGCTCTCCTGAATACTGG
 ATCAAAAGCGGTACATTGGTACCTGTTACTCGAAACGATATCGTCAAAAATTGAAGGAATTG
 ACGCCACCGGCGGCAACAACCAACCGAACATCCCTGACATCCCGGCACACCTTTGGTACTTC
 GGCTTAATCGGAACATGCCTTTAAAAGCTT

SEQ ID NO: 2 establece la secuencia de aminoácidos de TLL producida por el plásmido de expresión pHYT-TLLwt (la secuencia señal de AprE se subraya; sitio de escisión predicho por la Señal P):

MRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNMSASAAGKEVSQDLFNQFNLFQAQYSAAAYCGKNNNDAPAG
 TNITCTGNACPEVEKADATFLYSFEDSGVGDVTGFLALDNTNKLIVLSFRGRSRIENWIGNLNF
 LKEINDICSGCRGHDGFTSSWRSVADTLRQKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADL
 RGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQGGTLYRITHHTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWIKS
 GTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNIPDIPAHLWYFGLIGTCL

SEQ ID NO: 3 establece la secuencia de aminoácidos de la proteína madura de TLL producida por el plásmido de expresión pHYT-TLLwt con una extensión amino-terminal de tres aminoácidos

AGKEVSQDLFNQFNLFQAQYSAAAYCGKNNNDAPAGTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFEDSGV
 GDVTGFLALDNTNKLIVLSFRGRSRIENWIGNLNFDLKEINDICSGCRGHDGFTSSWRSVADTLR
 QKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTV
 QTGGTLYRITHHTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWIKSGTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNIPD
 IPAHLWYFGLIGTCL

SEQ ID NO: 4 establece la secuencia de aminoácidos de la proteína madura de TLL basada en la secuencia genética de origen natural

EVSQDLFNQFNLFQAQYSAAAYCGKNNNDAPAGTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFEDSGVGDV
 TGFLALDNTNKLIVLSFRGRSRIENWIGNLNFDLKEINDICSGCRGHDGFTSSWRSVADTLRQKV
 EDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQGGT
 LYRITHHTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWIKSGTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNIPDIPAH

5 LWYFGLIGTCL

EJEMPLO 3

Generación de bibliotecas de evaluación del sitio de TLL

10 **[0299]** Se crearon bibliotecas de evaluación del sitio (SEL) con GENEART mediante la utilización de un proceso patentado (WO 2004/059556A3) y para la fabricación de moléculas de ADN se empleó tecnología de la que GENEART es titular o licenciatario (Patente Europea n.º 0 200 362 y 0 201 184; y Patente Estadounidense n.º 4,683,195, 4,683,202 y 6,472,184). La construcción de las SEL de TLL descritas en este ejemplo fue realizada por GENEART utilizando su plataforma tecnológica para la generación de bibliotecas con el conocimiento y/o la

propiedad intelectual patentados de GENEART. El enfoque de permutación secuencial de GENEART para producir SEL se describe en general en el sitio web de la empresa.

5 **[0300]** El ADN plasmídico de pHYT-TLLwt sirvió como molde para producir SEL en todos los sitios de la región madura de TLL nativa (SEQ ID NO: 4). Los primeros tres aminoácidos (Ala-Gly-Lys) de la pro-región AprE en la proteína de TLL recombinante (SEQ ID NO: 3) no fueron mutagenizados. Se le encargó a GENEART la creación de los SEL en todas las posiciones de TLL nativas utilizando sus protocolos estándar (la numeración comienza desde el primer aminoácido de la proteína madura de TLL nativa). La biblioteca posicional para cada uno de los 269 residuos construidos por GENEART contenía aproximadamente 16 sustituciones de aminoácidos por sitio. Las bibliotecas consistían en células de *B. subtilis* transformadas que contienen el plásmido de expresión que codifica las secuencias de variantes de TLL en las 269 posiciones descritas. GENEART proporcionó las bibliotecas como 10 placas de 96 pocillos, una variante por pocillo, con los cultivos congelados en glicerol.

15 **[0301]** Los transformantes de *B. subtilis* que contienen variantes de sustitución de TLL se cultivaron en placas de 96 pocillos durante 16 horas en caldo de soja tríptico (TSB) con 10 mg/L de tetraciclina, y se añadieron 10 µl de este precultivo a MTP Corning 3599 llenos de 190 µl de Medio MBD (descrito a continuación) complementado con 25 mg/L de tetraciclina. Las placas se incubaron durante 60-65 horas a 37 °C con un 80 % de humedad con un mezclador rotativo constante a 300 rpm. Las células se recolectaron por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y se filtraron a través de una placa de filtro Millipore Multiscreen usando un sistema de vacío de Millipore. Los sobrenadantes de cultivo se utilizaron para los ensayos. El medio de cultivo (Medio MBD) era un medio semidefinido enriquecido a base de tampón MOP, con urea como fuente principal de nitrógeno, glucosa como 20 fuente principal de carbono, y complementado con un 1 % de soytona para un crecimiento celular sólido.

EJEMPLO 4

Posiciones productivas y mutaciones combinables

25 **[0302]** Se describen posiciones productivas como aquellas posiciones dentro de una molécula que son las más útiles para fabricar variantes combinatorias que presentan una característica mejorada, donde la propia posición permite al menos una mutación combinable. Las mutaciones combinables pueden describirse como aquellas sustituciones en una molécula que pueden utilizarse para elaborar variantes combinatorias. Las mutaciones combinables son mutaciones que mejoran al menos una propiedad deseada de la molécula, mientras que no reducen significativamente la expresión, la actividad ni la estabilidad.

30 **[0303]** Las mutaciones combinables son mutaciones que mejoran al menos una propiedad deseada de la molécula, mientras que no reducen significativamente la expresión, la actividad ni la estabilidad. Las mutaciones combinables en el polipéptido de TLL se determinaron mediante el uso de valores del índice de rendimiento (IR) resultantes de los ensayos descritos en el ejemplo 1: ensayo de micromuestras CS-61, hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenilo, estabilidad en detergentes, estabilidad en LAS y termoestabilidad.

35 **[0304]** Las mutaciones combinables se han agrupado de acuerdo con los siguientes criterios:
Una variante en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de *p*-nitrofenilo a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,9 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,0 (Grupo A).

40 **[0305]** Una variante en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de *p*-nitrofenilo a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,8 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,2 (Grupo B).

45 **[0306]** Una variante en la que los índices de rendimiento (IR) mínimo en relación con la TLL original para la expresión, la actividad de micromuestra CS-61 a un pH 8,2, la actividad en sustratos de ésteres de *p*-nitrofenilo a un pH 6 o un pH 8,2, y la estabilidad del detergente, la estabilidad de LAS o la termoestabilidad son mayores o iguales a 0,5 y, además, tienen un IR para cualquiera de estas pruebas mayor o igual a 1,5 (Grupo C).

50 **[0307]** Los grupos A, B y C también contienen posiciones de aminoácido que presentan distintos grados de tolerancia para múltiples sustituciones. Para identificar posiciones productivas, se mide el grado de sustituciones tolerado en cada posición y se le asigna una puntuación de productividad a cada posición. La puntuación de productividad fue asignada de acuerdo con el porcentaje de sustituciones en cada posición que entran en los grupos A, B o C, mediante la utilización de los criterios establecidos a continuación.

[0308] Las posiciones productivas se definen como las posiciones que han mostrado un grado determinado de tolerancia para múltiples sustituciones, al tiempo que cumplen con un conjunto de criterios de capacidad combinatoria establecidos a continuación.

55 **[0309]** Los criterios para determinar la puntuación de productividad de las posiciones productivas son los siguientes:

ES 2 865 080 T3

A las posiciones en las que el 50 % o más de las sustituciones en una posición determinada pertenece a los grupos A, B o C se les da una puntuación de productividad de "4". Estas posiciones incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 46, 51, 52, 54, 58, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 75, 90, 93, 94, 111, 120, 122, 123, 130, 131, 137, 140, 162, 163, 189, 250, 252 y 264.

5 **[0310]** A las posiciones en las que menos del 50 %, pero más de o el 30 % de las sustituciones en una posición determinada pertenecen a los grupos A, B o C, se les da una puntuación de productividad de "3". Estas posiciones incluyen 18, 19, 20, 30, 31, 32, 47, 48, 49, 50, 53, 56, 60, 73, 74, 85, 86, 91, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 115, 125, 127, 128, 132, 133, 151, 159, 164, 179, 183, 187, 188, 190, 216, 223, 232, 237, 244, 251, 254, 263, 267 y 269.

10 **[0311]** A las posiciones en las que menos del 30 %, pero más de o el 15 % de las sustituciones en una posición determinada pertenecen a los grupos A, B o C, se les da una puntuación de productividad de "2". Estas posiciones incluyen

7, 11, 12, 15, 22, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 61, 63, 65, 67, 76, 77, 84, 87, 114, 117, 119, 121, 134, 135, 136, 143, 154, 155, 156, 158, 165, 166, 168, 176, 180, 191, 199, 200, 202, 209, 211, 214, 217, 221, 224, 225, 228, 229, 231, 233, 248, 249, 253, 255, 256, 265 y 268.

15 **[0312]** A las posiciones en las que menos del 15 % de las sustituciones en una posición determinada pertenecen a los grupos A, B o C, se les da una puntuación de productividad de "1". Estas posiciones incluyen 14, 16, 17, 34, 41, 55, 57, 59, 62, 70, 79, 92, 100, 102, 103, 106, 109, 110, 112, 118, 126, 138, 139, 142, 149, 152, 153, 167, 169, 170, 181, 184, 192, 193, 196, 198, 205, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 226, 227, 230, 236, 238, 239, 242, 243, 246, 257, 259, 260, 262 y 266.

[0313] Las posiciones productivas en TLL que entran en las puntuaciones de productividad descritas anteriormente de "1, 2, 3 y 4" se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

25 **[0314]** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 176, 179, 180, 181, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 196, 198, 199, 200, 202, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 236, 237, 238, 239, 242, 243, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 259, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268 y 269.

30 **[0315]** Las posiciones productivas en TLL que entran en las puntuaciones de productividad descritas anteriormente de "2, 3 y 4" se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

35 **[0316]** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 111, 114, 115, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 140, 143, 151, 154, 155, 156, 158, 159, 162, 163, 164, 165, 166, 168, 176, 179, 180, 183, 187, 188, 189, 190, 191, 199, 200, 202, 209, 211, 214, 216, 217, 221, 223, 224, 225, 228, 229, 231, 232, 233, 237, 244, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 263, 264, 265, 267, 268 y 269.

40 **[0317]** Las posiciones productivas en TLL que entran en las puntuaciones de productividad descritas anteriormente de "3 y 4" se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

45 **[0318]** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 39, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 60, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 85, 86, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 111, 115, 120, 122, 123, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 137, 140, 151, 159, 162, 163, 164, 179, 183, 187, 188, 189, 190, 216, 223, 232, 237, 244, 250, 251, 252, 254, 263, 264, 267 y 269.

50 **[0319]** Las posiciones productivas en TLL que entran en las puntuaciones de productividad descritas anteriormente de "4" se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

[0320] 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 46, 51, 52, 54, 58, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 75, 90, 93, 94, 111, 120, 122, 123, 130, 131, 137, 140, 162, 163, 189, 250, 252 y 264.

55 **[0321]** Las posiciones productivas en TLL que entran en las puntuaciones de productividad descritas anteriormente de "1, 2, 3 y 4" y las sustituciones en esas posiciones que son combinables se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

- [0322]** 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 14(A,S,V); 15(Q,G,H,M,S); 16(Y,H,W); 17(S,E); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W);
 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W);
 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y);
 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y);
 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 34(I,P); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y);
 40(A,F,M,S,W); 41(C,V); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T); 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W);
 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W);
 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,V,W,Y); 55(F,G,W); 56(E,H,K,R,T,V); 57(D,S); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 59(G,D);
 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R); 62(D,N); 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,I,V,W,Y);
 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y); 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 70(D,S);
 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S);
 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 79(S,A,M); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 92(N,A,T);
 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V);
 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 100(I,M); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 102(D,H); 103(I,Y);
 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 106(G,H); 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 109(G,T); 110(H,N,S); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W);
 112(G,F,Q); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V); 118(R,P); 119(S,D,I,Q,T,V);
 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y);
 126(Q,I,M); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131
 (A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T);
 136(P,D,Q,R); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 138(Y,F); 139(RLT); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T);
 142(F,H,Y); 143(T,A,G,N,S); 149(G,A); 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 152(A,I,V); 153(T,S); 154(V,F,I,L,M,Y);
 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y);
 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y); 166(I,D,G,W); 167(D,N); 168(V,G,L,Q); 169(F,S,Y);
 170(S,G); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T); 181(F,L); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 184(F,W,Y);
 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V);
 192(T,N,P); 193(L,T); 196(I,V); 198(H,G,S); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 205(R,D); 206(L,N);
 208(P,E,N); 209(R,H,S,T); 210(E,S); 211(F,I,R,T,W); 212(G,Q); 213(Y,S); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 217(S,H,K,V); 218(P,T); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 226(T,D,N);
 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 230(V,W); 231(T,G,H,K,L,M); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W);
 233(N,D,G,H,Q); 236(L,W,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 238(I,V); 239(E,K); 242(D,T); 243(A,S); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S);
 246(G,I); 248(N,D,L,Y); 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y);
 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T);
 257(A,W,Y); 259(L,W,Y); 260(W,P); 262(F,D,K); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T);
 265(I,L,M,Q,R,W); 266(G,E); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); y 269(L,D,F,M,Q,V,W).

[0323] Las posiciones productivas en TLL que entran en las puntuaciones de productividad descritas anteriormente "2, 3 y 4" y las sustituciones en esas posiciones que son combinables se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

- [0324]** 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 15(Q,G,H,M,S); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T);
 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,W,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W,Y);
 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y);
 40(A,F,M,S,W); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T); 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W);
 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W);
 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,V,W,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R);
 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y); 67(L,H,I,Q,V);
 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y);
 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S);
 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W);
 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q);
 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W);
 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V); 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q);

- 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T);
 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y);
 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T); 136(P,D,Q,R);
 5 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y); 166(I,D,G,W);
 168(V,G,L,Q); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y);
 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V);
 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 209(R,H,S,T); 211(F,I,R,T,W); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 10 217(S,H,K,V); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 227(L,C,H,M);
 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 231(T,G,H,K,L,M); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y);
 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 248(N,D,L,Y); 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y);
 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T);
 15 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); y
 269(L,D,F,M,Q,V,W).

[0325] Las posiciones productivas en TLL que entran en las puntuaciones de productividad descritas anteriormente "3 y 4" y las sustituciones en esas posiciones que son combinables se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

- [0326]** 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 20 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W);
 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W);
 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y);
 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y);
 25 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y);
 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W);
 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y);
 30 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y);
 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y);
 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W);
 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q);
 35 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W);
 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W);
 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y);
 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V);
 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 151(L,I,M,N,P,T,V,W);
 40 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V);
 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T);
 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V,W);
 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T);
 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T); 254(D,A,H,K,N,P,T); 256(P,A,D,S,T);
 45 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 267(T,G,I,L,M,P,W); y 269(L,D,F,M,Q,V,W).

[0327] Las posiciones productivas en TLL que entran en las puntuaciones de productividad descritas anteriormente "4" y las sustituciones en esas posiciones que son combinables se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

- [0328]** 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 50 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y);
 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S);
 55 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y);
 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y);
 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W);
 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y);
 60 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W);
 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y);
 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T);

162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V);
250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); y 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T).

5 **[0329]** En un estudio posterior, se analizaron sustituciones adicionales de posiciones productivas en TLL y se descubrió que eran combinables. Las sustituciones adicionales en esas posiciones que son combinables se indican a continuación. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO. 3.

[0330] 11(A,E,I), 23(A), 24(Q,S), 27(K,L), 29(N), 30(E,G,I,S,Y), 31(T), 33(C,I,P,T,V), 45(A,G,S,T), 48(N,R,T,V), 49(C,Y), 50(M), 51(H,V), 56(A,M,N,S), 58(A,F), 71(C,F,P), 73(Q,T), 74(I,M,T,W), 75(K), 91(K,N,Y), 94(A,H), 101(A), 108(A), 111(G,H,I,K,M,S,Y), 122(K,L,Q), 128(T,V), 130(K,M), 133(D,H,L,W), 135(A,D,M,N,Y), 140(Y), 159(G), 163(Q), 183(C), 187(C,I), 188(A,M,W), 190(W), 227(A,I,S), 233(F,I,V), 251(V), 252(M,V).

10 **EJEMPLO 5**

Mutaciones combinables y puntuaciones de idoneidad

15 **[0331]** Como se muestra en el ejemplo 3, las mutaciones combinables en TLL se determinaron mediante el uso de valores del índice de rendimiento (IR) resultantes de los ensayos descritos en el ejemplo 1: Ensayo de micromuestras CS-61, hidrólisis de ésteres de p-nitrofenilo, (actividad), ensayos de estabilidad del detergente, estabilidad de LAS y termoestabilidad, y determinación de proteínas (expresión). Las mutaciones combinables se asignaron a los grupos A, B o C de acuerdo con los criterios establecidos en el ejemplo 3. A estas sustituciones se les asigna, además, una puntuación de idoneidad basada en el o los grupos (A, B, C) donde aparece la sustitución, y donde puntuaciones de idoneidad más altas representan una sustitución más adecuada para su uso en la elaboración de variantes combinatorias. Las puntuaciones de idoneidad se definen en la tabla 5.1. Las
20 puntuaciones de idoneidad para sustituciones individuales de TLL que cumplen los criterios anteriores se proporcionan en la tabla 5.2.

[0332] En la tabla 5.1, se define cada puntuación de idoneidad en lo que se refiere a grupos de mutaciones combinables y posiciones productivas.

Tabla 5.1: Puntuación de idoneidad	
Las sustituciones se producen en el grupo o los grupos	Puntuación de idoneidad
A, B y C	
A y B	++++
A o (B y C)	+++
B	++
C	+

25 En la tabla 5.2, se identifica la puntuación de idoneidad de sustituciones individuales en TLL. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO: 3.

Tabla 5.2: Puntuación de idoneidad de sustituciones individuales en TLL						
POS	PUNTUACIÓN DE IDONEIDAD DE LAS VARIANTES					
	(+)	(++)	(+++)	WT AA 1ST	(++++)	(+++)
1	CL		ERV		QT	ADFINPSWY
2		K	VHT		FGMP	IL
3	R	AH	SEQ		KT	DGY
4		P	QY		AGIKLMNRS	DFW
5			D		KW	HILSTVY
6	AH	KY	LQV		EM	IT
7	MV	H	F			Y
8	K		N		AE	GHILMTVWY
9	Y	DW	QAI		EGNR	HK
11			N		HKY	V

Tabla 5.2: Puntuación de idoneidad de sustituciones individuales en TLL					
POS	PUNTUACIÓN DE IDONEIDAD DE LAS VARIANTES				
	(+)	(++)	(+++)	WT AA 1ST	(++++)
12		W	L	FHV	
13	KTV	AMY	F	Q	HN
14	V		A		S
15	GH	M	Q	S	
16		H	Y		W
17			S		E
18	MNW		ACHS	Q	K
19	ILVW		AT	C	G
20	I	Q	AP	GS	T
22	LM	H	C		
23		R	GP	CFLMSW	DFHTKNQTV
24	MR		KF	Y	ADEHILNPTVW
25	E	S	NADGVW	CHK	ILT
26			NLQ	C	GKMSTVWY
27			D	F	AEGHINQRSTVY
28			AFGL	HMPQR	DEINS
29		GS	PCI	QWY	FHKLMRTV
30		LN	AHRW	DV	
31	MPV		G	EQ	DHS
32			TQ	AIMRS	
33		M	NK		DEFLQRS
34			I		P
35			TER	K	
37	RY	H	TAFLM	C	DEGIKPQW
38	AE		GT	VW	DFHIKLMNY
39	CW	Q	N	PTY	EHILSV
40		F	A	W	MS
41	V		c		
42	C		P	V	GIW
43			EI	DM	RT
44			VHT		I
45			E	Q	FV
46			KE	FGVW	DLM
47		W	ADEFM	T	H
48	L	G	D		EHPQ
49	GLW		AHK		V
50		FK	TDW	A	LRS

Tabla 5.2: Puntuación de idoneidad de sustituciones individuales en TLL					
POS	PUNTUACIÓN DE IDONEIDAD DE LAS VARIANTES				
	(+)	(++)	(+++) WT AA 1ST	(++++)	(+++)
51		DPY	F	NRT	AEGILMS
52		M	LT	ERW	AGIV
53			YLW	EGHKS	
54	EHM	FGKW	S	RY	PTV
55		W	F	G	
56			E	V	HKRT
57	S		D		
58	DR	I	SGHKQW		M
59	D		G		
60	KY	L	V		G
61	ADR		GL		
62	N		D		
63	KQ		V		T
64		KRY	TDIL	CENV	G
65	Y	L	GV		
66	AST	GY	FILV	NQR	HMW
67		H	L	Q	IV
68		Y	ACW		GISTV
69		D	L	AGHNW	IKST
70			D		S
71			NE	VWY	DHKQRST
72			TK	P	ADEFHILNRSVY
73			N	EGK	HRS
74	E		KADG	NQ	HS
75		M	L	DNRY	AEGHIQSTV
76	S		IV	H	
77			VA	ILNT	
79	M		S		A
84	QW	H	R		
85	FI		SHNQ		T
86		Q	IVY	LM	PT
87	A		ED	PV	G
90		Y	IV	QT	AEFN
91			G	F	EHIMQR
92		A	N		T
93	HNW	IPV	LDKQR		
94	KMP	S	NGTV	D	R

Tabla 5.2: Puntuación de idoneidad de sustituciones individuales en TLL						
POS	PUNTUACIÓN DE IDONEIDAD DE LAS VARIANTES					
	(+)	(++)	(+++)	WT AA 1ST	(++++)	(+++)
95		HT	FKL			GQVW
96	PR	V	D			AK
97	I		LAM	Q		DT
98		M	KH	DEI		Q
99	PQ		E	K		DSTW
100		M	I			
101	CEM		N			DHY
102	H		D			
103	Y		I			
105	F		SW	ADEP		K
106	H		G			
108			RF	EM		KQY
109	T		G			
110	N		HS			
111	FW		D			AELQTV
112	FQ		G			
114			T			FIMV
115	IL	N	SGMRV			T
117	K	Q	WHV			
118			R			P
119	QV		SDI			T
120	I		VGHNSW			Y
121	Q		A			K
122		STY	DAF	EN		HI
123	IK		T	ELQ		GMNW
125	C	I	RY	NT		GQ
126		M	Q	I		
127		D	K	EFR		GT
128	LNW	Y	VCI	HS		
130	E	CR	DVWY	FQ		AGHT
131	CN		AKST	RWY		HIQ
132	C	I	VQ	DKW		HR
133	FNV		RI	EQ		
134		P	E			LV
135			H	FT		K
136	R		P	DQ		
137	AFLMNP		DIRW	SV		EGHKQTY

Tabla 5.2: Puntuación de idoneidad de sustituciones individuales en TLL					
POS	PUNTUACIÓN DE IDONEIDAD DE LAS VARIANTES				
	(+)	(++)	(+++)	WT AA 1ST	(++++)
138	F		Y		
139			R	L	T
140	EILN	C	V	FMQT	
142			FHY		
143	N		T	AGS	
149			G	A	
151		P	LMW	N	ITV
152	I	V	A		
153			TS		
154	MY		V	F	IL
155	T		A		GS
156		T	GM	FW	
158			D	Y	EF
159	MW		LQR	E	
162	MPY		NDEFHIKQS		GR
163	AMR		GFL	SW	NPY
164		DR	Y	NS	V
165	P	Y	D	I	
166			I	DW	G
167			D	N	
168	Q		VG	L	
169	Y		FS		
170	G		S		
176	FNW		V		IL
179			RHK	EI	LQV
180	DQ		AT		K
181			F		L
183	HMQSTY		E	V	
184	W		FY		
187			V		GHLNQSTW
188	ER	F	Q	H	CT
189	EM		T	KV	DGNQRS
190	DHRSY		G		
191			G		FLV
192	NP		T		
193			LT		
196			I		V

Tabla 5.2: Puntuación de idoneidad de sustituciones individuales en TLL					
POS	PUNTUACIÓN DE IDONEIDAD DE LAS VARIANTES				
	(+)	(++)	(+++)	WT AA 1ST	(++++)
198			HGS		
199	NV		T		G
200	P		NS	A	
202	M		IL		PV
205			R	D	
206	N		L		
208		N	P		E
209			RH	ST	
210	S		E		
211			FRT		IW
212	Q		G		
213		S	Y		
214	M		SA	D	
216		D	SV	GQ	NW
217			SV	H	K
218			P	T	
221	FGY		W		
223	HL		KA	M	QSTV
224	AFP		S		
225	C		G		EKR
226	D		T	N	
227		C	LH		M
228	A		V	E	R
229	MS	I	P	K	
230			VW		
231	G		TH	KLM	
232	DW	CL	RP		IMT
233			N		DGHQ
236	W		V		
237		E	KHTW		ILY
238	V		I		
239	K		E		
242			D		T
243	S		A		
244	AFLMP		TQS		I
246	I		G		
248	DLY		N		

Tabla 5.2: Puntuación de idoneidad de sustituciones individuales en TLL						
POS	PUNTUACIÓN DE IDONEIDAD DE LAS VARIANTES					
	(+)	(++)	(+++)	WT AA 1ST	(++++)	(+++)
249	GT	E	Q			
250	DGKT	E	PS			QR
251	MQSTY		N			DW
252	W	F	ICE		KLN	ADGHQRST
253	FHN		PR			
254	NP	AK	DT		H	
255	W		I		F	L
256	D		P		T	AS
257		W	A			Y
259	WY		L			
260	P		W			
262	K		F			D
263	CHM		GK		IV	
264			LCG		HST	EMNPQR
265	LRW		I			MQ
266	E		G			
267		I	TGM		P	LW
268	DN		CH			
269			L		F	DMQVW

EJEMPLO 6

Modificaciones de superficie

[0333] Las posiciones y sustituciones que contribuyen a modificaciones de superficie favorables, como la carga alterada o la hidrofobicidad de TLL, se establecen en la tabla 5.1. Las posiciones productivas que contienen todas las sustituciones combinables se determinaron usando los criterios para posiciones productivas como se describe en el ejemplo 3. Los datos se analizaron adicionalmente para determinar las sustituciones que cambian la hidrofobicidad o la carga y mantienen todas las propiedades importantes. La hidrofobicidad de cada sustitución se determinó mediante la utilización de los métodos de White y Wimley (White, S. H. y Wimley, W. C., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Strut. 28:319-65, (1999)). En la tabla 6.1, se muestra un subgrupo de sustituciones y posiciones combinables que muestran modificaciones de superficie favorables en TLL.

En la tabla 6.1, se establecen sustituciones que muestran modificaciones de superficie favorables. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO: 3

Tabla 6.1: Sustituciones y posiciones combinables con modificaciones de superficie favorables	
VARIANTE	TIPO
A018K	HIDRO, CARGA
D027N	HIDRO, CARGA
D027S	HIDRO, CARGA
D027T	HIDRO, CARGA
D027V	HIDRO, CARGA
P029E	HIDRO, CARGA
N033D	HIDRO, CARGA

N033E	HIDRO, CARGA
N033R	HIDRO, CARGA
F051T	HIDRO
S058M	HIDRO
T072R	HIDRO, CARGA
L075Q	HIDRO
N101D	HIDRO, CARGA
R108K	HIDRO
R108Q	HIDRO, CARGA
R108Y	HIDRO, CARGA
T114F	HIDRO
T114I	HIDRO
A121K	HIDRO, CARGA
H135F	HIDRO
D137V	HIDRO, CARGA
G156W	HIDRO
G163Y	HIDRO
V187N	HIDRO
V187W	HIDRO
P250E	HIDRO, CARGA
I252A	HIDRO
I252T	HIDRO
L264P	HIDRO

EJEMPLO 7

Mutaciones combinables basadas en rendimiento detergente

5 **[0334]** Se identificaron mutaciones combinables adicionales en TLL mediante la utilización de valores de índice de rendimiento (IR) resultantes del ensayo de micromuestras CS-61 (realizado con media dosis, con media dosis + adyuvante o con dosis completa), la estabilidad del detergente y la determinación de proteínas (expresión). En la tabla 7.1, se identifican sustituciones y posiciones combinables que muestran índices de rendimiento (IR) en relación con la TLL original para la expresión $\geq 0,8$, la estabilidad del detergente $\geq 0,8$ y el rendimiento detergente $\geq 1,1$ con media dosis, con media dosis + adyuvante o con dosis completa. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO: 3.

10

Grupo	Índice de rendimiento (IR) [Rendimiento detergente]				
	Expresión	Estabilidad del detergente	Rendimiento de limpieza		
			Media dosis	Media dosis + adyuvante	Dosis completa
I	$\geq 0,8$	$\geq 0,8$	$\geq 1,1$		
II	$\geq 0,8$	$\geq 0,8$		$\geq 1,1$	
III	$\geq 0,8$	$\geq 0,8$			$\geq 1,1$

Tabla 7.1: Rendimiento detergente

ES 2 865 080 T3

Grupo I		Grupo II		Grupo III	
POS	Sustitución	POS	Sustitución	POS	Sustitución
1	S	1	S	1	s
5	H, I, S, T	3	T	5	H, I, T
8	H	4	F	23	E, Q
9	K, N	5	H, I, S, T	29	H, I, R, T
11	H, K	8	H, T, V	39	H, I
13	N	9	G, H, K	43	R, T
19	G	11	K	54	T
23	K, N, Q, R	12	V, W	58	Q
27	Q, R	18	K	115	T
29	K, R	19	G	130	A, R
32	A	23	K, Q, R	154	L
33	D	27	R, S	158	E
37	G, H, Q	32	I	180	K
38	F, L, M, W, Y	38	F, L, M, W, Y	187	T
39	F, L, M, W, Y, I, L	39	I, P	228	R
42	W	43	I, R, T	269	W
43	D, I, R, T	45	F, Q		
45	F, Q, V	53	K		
51	M	54	P		
53	E	56	K, R		
54	P	58	H, Q		
56	H, K, R	75	G, Q, R		
58	H, K, Q, W	77	I		
69	R	90	T		
73	R	91	I, Q		
75	A, R	105	P		
75	T	123	N		
77	I, L, T	127	F		
90	F, T	130	A, F, H, Q, R		
91	I, Q	131	R		
94	R	136	Q		
105	P	137	R, S		
108	K	143	S		
122	F	156	T		
125	T	162	G		
130	A, R	163	S		
132	K, R	164	R, V		
134	L	166	G		

137	R	180	K		
151	T	187	G, H, N, Q, S, T, W		
155	S	188	F		
156	W	189	D, G		
163	F, P	199	G		
164	R	228	R		
180	K	252	N		
183	V	264	R		
184	Y	265	Q		
187	G, H, N, Q, S, T, W				
189	G, Q				
211	I				
214	A				
228	R				
232	P				
233	Q				
244	I				
252	N				
265	Q				

EJEMPLO 8

Mutaciones combinables basadas en estabilidad

5 [0335] Se identificaron mutaciones combinables adicionales en TLL mediante la utilización de valores de índice de rendimiento (IR) resultantes de ensayos de termoestabilidad, estabilidad del detergente o estabilidad de LAS, de la hidrólisis del sustrato de pNPO a pH 8 y de la determinación (expresión) de proteínas. En la tabla 8.1, se identifican sustituciones y posiciones combinables que muestran índices de rendimiento (IR) en relación con la TLL original para la expresión $\geq 0,8$, la hidrólisis de sustrato de pNPO a pH 8 $\geq 0,8$, y la termoestabilidad, la estabilidad del detergente o la estabilidad de LAS $\geq 1,1$. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO: 3.

10

Grupo	Índice de rendimiento (IR) [Estabilidad]				
	Expresión	Hidrólisis de pNPO (pH 8)	Estabilidad		
			Termoestabilidad	Estabilidad del detergente	Estabilidad de LAS
IV	$\geq 0,8$	$\geq 0,8$	$\geq 1,1$		
V	$\geq 0,8$	$\geq 0,8$		$\geq 1,1$	
VI	$\geq 0,8$	$\geq 0,8$			$\geq 1,1$

Tabla 8.1: Estabilidad					
Grupo IV		Grupo V		Grupo VI	
POS	Sustitución	POS	Sustitución	POS	Sustitución
2	I	12	F	1	F, R
11	K	13	Q	4	K, L, N, W
15	S	15	S	5	K
18	K	19	C, G	11	K
23	C,D,E,F,H,I,K,M,N,Q,S,T,V	20	P	23	K
24	H	23	D, E, F, I, V	27	A, H, N, R, S, T, V
26	T	24	W	37	P
27	A,G,H,N,Q,R,S,T,V	26	C, T, W, Y	38	H, K, L, W, Y
29	E	28	D, P	42	V
37	P	31	E	43	I, R
48	E, Q	34	P	45	F, Q, V
50	S	37	C, D	47	T
51	A,I,L,S,T	39	E, L, P	49	V
56	K,V,	42	I, V	51	I, M, S
58	M	45	F, V	56	H, K, S, T
66	N, Q	46	F, G, L, W	58	M, Q
75	A, G, Q, R	47	F, M, T, W	73	S
77	I, T	49	H, V	75	D, E, G, Q, R
91	E, Q	51	A, G, I, L, M, S, T	91	Q
94	R	60	L	94	R
96	K	64	V	101	D
99	D, S	66	Q	108	K
101	D, H	68	S, T, V	111	A
108	K, M, Y	73	E, G, R, S	119	D, T
111	A, E, Q	75	E, G, Q, R	120	Y
114	F, I, V	77	A, L, N, T	154	I
117	Q	91	E, Q	179	L
120	N	94	D	187	T
121	K	108	E, F, M, Q, Y	189	D, Q
135	F	114	F, I, V	200	A
137	I, Q, R	127	T	209	S
154	F, I, L	128	H, S, Y	211	W
155	G, S	131	R, W, Y	226	N
156	W	132	D	250	E, Q
163	F	133	E, Q	251	W
169	S	136	D, Q	252	A
176	I	139	M	256	T

Tabla 8.1: Estabilidad					
Grupo IV		Grupo V		Grupo VI	
POS	Sustitución	POS	Sustitución	POS	Sustitución
187	H, N, W	140	F, M, Q		
226	N	142	Y		
250	E	154	I		
252	A	155	S		
256	T	156	W		
264	C, H, M, P, Q, S	159	E, R		
265	M	163	F, L, P, Y		
269	Q	168	G, L		
		179	L		
		187	H, N, Q, T		
		188	F		
		189	D		
		205	D		
		208	E		
		209	S		
		214	D		
		223	T		
		225	E		
		228	E		
		237	L, Y		
		250	E		
		251	D		
		252	A		
		256	T		
		264	C, H, P, Q, S		
		265	M		

EJEMPLO 9

Mutaciones combinables basadas en hidrólisis de éster

5 **[0336]** Se identificaron mutaciones combinables adicionales en TLL mediante la utilización de valores de índice de rendimiento (IR) resultantes de la hidrólisis de sustratos de pNPB, pNPO y pNPP a pH 8, la termoestabilidad y la determinación (expresión) de proteínas. En la tabla 9.1, se identifican sustituciones y posiciones combinables que muestran índices de rendimiento (IR) en relación con la TLL original para la expresión $\geq 0,8$, termoestabilidad $\geq 0,8$, e hidrólisis de pNPB $\geq 1,1$, o hidrólisis de pNPO $\geq 1,1$, o hidrólisis de pNPP $\geq 1,1$, o hidrólisis de pNPB y pNPO $\geq 1,1$, o hidrólisis de pNPO y pNPP $\geq 1,1$ o hidrólisis de pNPB, pNPO y pNPP $\geq 1,1$. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO: 3.

10

Índice de rendimiento (IR) [Hidrólisis]					
Grupo	Expresión	Termoestabilidad	Hidrólisis de éster		
			pNPB	pNPO	pNPP

ES 2 865 080 T3

VII	≥ 0,8	≥ 0,8	≥ 1,1		
VIII	≥ 0,8	≥ 0,8		≥ 1,1	
IX	≥ 0,8	≥ 0,8			≥ 1,1
X	≥ 0,8	≥ 0,8	≥ 1,1	≥ 1,1	
XI	≥ 0,8	≥ 0,8		≥ 1,1	≥ 1,1
XII	≥ 0,8	≥ 0,8	≥ 1,1	≥ 1,1	≥ 1,1

Tabla 9.1: Hidrólisis de éster											
Grupo VII		Grupo VIII		Grupo IX		Grupo X		Grupo XI		Grupo XII	
POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS
2	I,L	1	D	1	Q,S	2	L	3	D,T	3	D
3	D	2	L	3	D,T	3	D	4	A,D,L, M	4	D,L
4	D,I,L, W	3	D,T	4	A,D,L, M	4	D,L	5	H,Y	5	H
5	H,Y	4	A,D,L,M	5	H,S,Y	5	H,Y	23	F	5	Y
8	H,M	5	H,Y	9	M	8	M	27	E,N,Q,T	27	Q, T
9	K	8	A,E,M	11	K	18	K	29	R	29	R
11	H,K	9	R	12	F	24	A,T	33	D,Q	40	M
18	K	18	K	15	S	26	K	40	M	108	K
23	K	23	D,E,F,N,Q	23	F	27	A,I, Q,T	48	Q	111	L
24	A,T	24	A,D,E,H,N, T	27	E,N,Q, T	29	R	51	I,L,T	134	L
26	K,T	26	G,K	29	R	40	M	56	H,K,R,T	137	H,K, S,Y
27	A,I,Q, T	27	A,E,I,N,Q,T	32	A,Q,S	75	M	58	M,Q	162	G
29	H,I,K, R,T, V	29	E,Q,R	33	D,Q	108	K,Y	75	R	163	Y
30	R,V	33	D,E,F,M,Q, R,S	35	E,K,R	111	L,T	77	I,T	187	H,S, W
32	S	37	D,E,P,Q	40	M	122	Y	87	P	232	P
35	K	38	D,N	48	Q	123	Q	108	K		
37	G	40	M	51	I,L,M,T	125	Q	111	A,L		
40	M	48	E,Q	56	H,K,R, T	130	F,H	114	M		
54	V	49	V	58	M,Q	134	L	115	R		
69	A,K	50	E,F	71	E	137	H,K, S,T, W,Y	127	E,F		
71	R	51	I,L,T	75	R	155	G	130	A		
72	L	54	F,R	77	I,T	156	W	132	Q,R		

Tabla 9.1: Hidrólisis de éster											
Grupo VII		Grupo VIII		Grupo IX		Grupo X		Grupo XI		Grupo XII	
POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS
74	A	56	H,K,R,T	87	P	162	G	134	L		
75	M,S	58	M,Q	105	A	163	Y	137	E,G,H,I,K ,Q,R,S,Y		
91	I	64	N	108	K	176	I	155	S		
94	R	66	Q	111	A,L	180	K	162	G		
101	Y	74	Q	114	M	187	H,S, T,W	163	F,P,S,W, Y		
108	K,Y	75	E,M,N,Q,R	115	R	232	P	187	H,N,Q,S, W		
111	L,T,V	77	A,I,L,T	127	E,F	233	D	189	R		
114	I	87	P	130	A	265	M	225	E		
122	T,Y	90	E,F,Q	132	Q,R,W	269	M	227	M		
123	Q	101	D	134	L			232	P		
125	Q	105	D,P	137	E,G,H,I ,K,Q,R, S,Y			233	Q		
130	F,H	108	K,Q,Y	143	A			264	R,T		
132	H,W	111	A,E,L,Q,T	155	S						
134	L,V	114	F,M	162	G						
137	H,K, S,T, W,Y	115	R	163	F,P,S, W,Y						
151	T,W	117	Q	164	D,R						
155	G	120	N	165	I,Y						
156	W	122	Y	187	H,N,Q, S,W						
162	G	123	E,L,M,N,Q	189	R						
163	Y	125	Q	225	E						
166	G	127	E,F,R	227	A,M						
176	I	130	A,F,H,Q	232	P						
180	K	132	K,Q,R	233	Q						
187	H,S, T, W	134	L	244	I						
189	K	137	E,G,H,I,K, Q,R,S,T,V, W,Y	252	A,K,L, R						
232	L,P	154	F,L	263	I,V						
233	D,H	155	G,S	264	H,R,T						
237	L,Y	156	F,W	269	V						
244	I	158	E,F,Y								
252	L,T	162	G,R								

Grupo VII		Grupo VIII		Grupo IX		Grupo X		Grupo XI		Grupo XII	
POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS	POS	SUS
255	L	163	F,P,S,W,Y								
263	I,V	169	S								
265	M	176	I								
269	M	180	K								
		187	H,N,Q,S,T, W								
		189	D,Q,R								
		225	E								
		227	M								
		228	E								
		232	P								
		233	D,G,Q								
		264	E,M,N,P,Q, R,S,T								
		265	M								
		269	M,Q								

EJEMPLO 10

Mutaciones combinables basadas en la alteración de la relación de hidrólisis de los sustratos C4:C16

5 [0337] Se identificaron mutaciones combinables adicionales en TLL mediante la utilización de valores de índice de rendimiento (IR) resultantes de la hidrólisis de sustratos de pNPB y pNPP a pH 8, la termoestabilidad y la determinación (expresión) de proteínas. En la tabla 10.1, se identifican sustituciones y posiciones combinables que muestran índices de rendimiento (IR) en relación con la TLL original para la expresión $\geq 0,8$, la termoestabilidad $\geq 0,8$, y la hidrólisis de pNPB $\leq 0,8$ y la hidrólisis de pNPP ≥ 1 . Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO: 3.

Grupo	Índice de rendimiento (IR)			
	Expresión	Termoestabilidad	Hidrólisis de éster	
			pNPB	pNPP
XIII	$\geq 0,8$	$\geq 0,8$	$\leq 0,8$	≥ 1

10

Grupo XIII	
Pos	Sustitución
1	Q
9	M
12	F
15	S
23	F

27	E
32	Q
35	E
48	Q
58	M, Q
71	E
75	R
115	R
130	A
132	Q, R
137	E, I, Q, R
143	A
155	S
163	F, P, S
164	D
165	I, Y
187	Q
225	E
227	A, M
233	Q
252	A, K, R
264	H, R, T
269	V

EJEMPLO 11

Mutaciones combinables basadas en hidrólisis con pH bajo

5 **[0338]** Se identificaron mutaciones combinables adicionales en TLL mediante la utilización de valores de índice de rendimiento (IR) resultantes de la hidrólisis de pNPO a pH 6, la termoestabilidad y la determinación (expresión) de proteínas. En la tabla 11.1, se identifican sustituciones y posiciones combinables que muestran índices de rendimiento (IR) en relación con la TLL original para la expresión $\geq 0,8$, la termoestabilidad $\geq 0,8$, y la hidrólisis de pNPO a pH 6 $\leq 1,1$. Numeración de posición basada en la TLL madura indicada en SEQ ID NO: 3.

Grupo	Índice de rendimiento (IR) [Hidrólisis con pH bajo]		
	Expresión	Termoestabilidad	pNPO a pH 6
XIV	$\geq 0,8$	$\geq 0,8$	$\geq 1,1$

10

Tabla 11.1: Hidrólisis con pH bajo	
Grupo XIV	
POS	Sustitución
1	Q,S
2	L

Tabla 11.1: Hidrólisis con pH bajo	
Grupo XIV	
POS	Sustitución
3	T
4	A, D, L, M
5	H, Y
9	K
11	K
12	F
15	S
24	A, D, E, H, N
27	A, E, Q, T
29	R
32	A
33	D, F, Q
38	D
40	M
48	Q
49	V
51	I, L, M, T
56	H, K, T
58	M, Q
69	A
75	R
77	T
91	Q
94	R
98	I
105	A
108	K, Y
111	A, L
114	I, M, V
121	K
123	E, L, M, N, Q
125	Q
127	E, F
130	A, H
132	R
134	L
137	E, G, H, I, K, Q, R, S, V, Y

Tabla 11.1: Hidrólisis con pH bajo	
Grupo XIV	
POS	Sustitución
143	A
151	P
154	F, I, L
155	S
156	W
158	Y
162	G
163	F, P, W, Y
164	D, R
165	I, Y
180	K
187	H, N, Q, S, T, W
189	R
227	M
228	R
232	P
252	L
263	I, V
265	M
269	M

EJEMPLO 12**Prueba para actividad de lipasa en diferentes niveles de adyuvante**

- 5 **[0339]** La actividad de esterasa de la enzima original de TLL se determinó en presencia de diferentes niveles de cuatro compuestos adyuvantes (tabla 12.1). Cada adyuvante se mezcló en concentraciones correspondientes a su concentración micelar crítica (CMC), la mitad de la CMC o una cuarta parte de la CMC en tampón HEPES 0,05 M, pH 8,2 y con 6 gpg de dureza de agua añadidos. La velocidad de hidrólisis del octanoato de pNP se midió como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1B. Para los cuatro compuestos adyuvantes, la actividad de esterasa de la enzima original de TLL es significativamente mayor en el nivel de una cuarta parte de CMC en comparación con el nivel de CMC completa o la mitad de CMC (Figura 1).

10

Tabla 12.1.

Tipo	Ejemplos	CMC (mM)
No iónico	n-Dodecil- β -D-maltopiranosido (D310)	0,17
Zwitteriónico	LysoFos Colina 14 (L214)	0,036
	Anzergent 3-12 (AZ312)	2,8
	CHAPSO (C317)	8

REIVINDICACIONES

1. Variante de enzima lipolítica que comprende una modificación de aminoácido con respecto a una enzima lipolítica original, donde la modificación se encuentra en una posición productiva de la variante de enzima lipolítica, donde la posición productiva es 130 y la modificación productiva es 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y),
 5 donde la enzima lipolítica original es la *Thermomyces lanuginosus* establecida en SEQ ID NO:4, donde las posiciones de aminoácido de la variante de lipasa están numeradas por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL establecida en SEQ ID NO:4, y donde la variante presenta al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 4. Q, R).
2. Variante de enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la modificación productiva es 130 (A, F,
 10 H,
3. Variante de enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la modificación productiva es 130 (A, R).
4. Variante de enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la modificación productiva es 130 (F,H).
5. Variante de enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la modificación productiva es 130
 15 (A,F,H,Q).
6. Variante de enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la modificación productiva es 130 (A).
7. Variante de enzima lipolítica o fragmento activo de la misma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicha variante presenta una propiedad mejorada en comparación con una enzima lipolítica original, donde la propiedad mejorada es el rendimiento de limpieza, la hidrólisis mejorada, la especificidad de sustrato
 20 alterada, la estabilidad del detergente o la termoestabilidad.
8. Composición de limpieza que comprende al menos una variante de enzima lipolítica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Composición de limpieza de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicha composición de limpieza es una composición detergente.

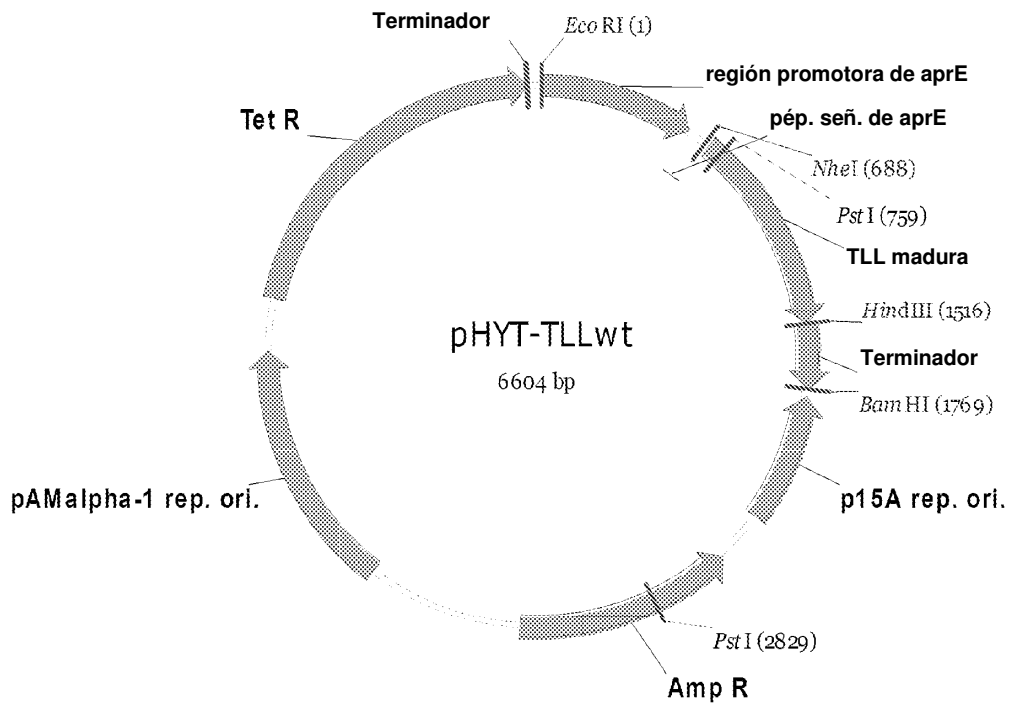


Figura 1

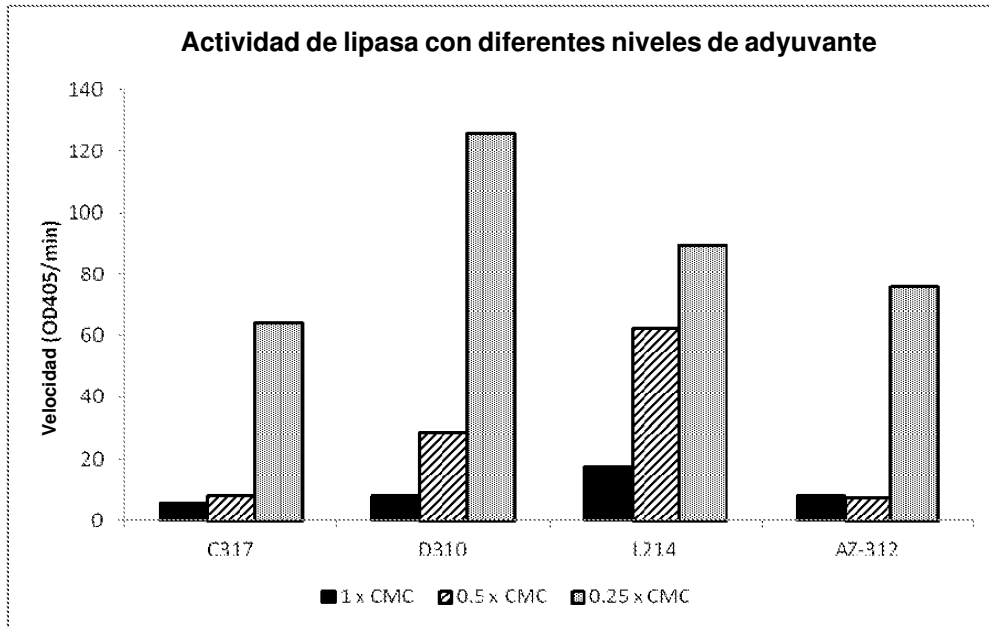


Figura 2