

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 357**

51 Int. Cl.:  
**C11D 3/386** (2006.01)  
**D06F 39/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08774456 .1**  
96 Fecha de presentación: **27.06.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2173845**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **Sistema de suministro secuencial de enzimas**

30 Prioridad:  
**03.08.2007 EP 07113806**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.11.2012**

73 Titular/es:  
**UNILEVER N.V. (100.0%)**  
**Weena 455**  
**3013 AL Rotterdam , NL**

72 Inventor/es:  
**KOTSAKIS, PANOS y**  
**PARRY, NEIL, JAMES**

74 Agente/Representante:  
**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

ES 2 391 357 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

Sistema de suministro secuencial de enzimas

5 La presente invención se refiere al suministro secuencial de enzimas durante un proceso de lavado.

Se conoce la utilización de mezclas de enzimas durante un proceso de lavandería. El documento WO 2000/070006 divulga combinaciones de proteasa/celulasa. Los documentos US 20050089966, EP 1664258, US 20050059567 y US 20060172913 divulgan mezclas de enzimas para la eliminación de manchas de hierba y de huevo.

10 El documento US 5733763 divulga un granulado de enzimas que comprende una primera enzima en el núcleo y una segunda enzima en una carcasa que circunda a dicho núcleo. El documento US 20050245418 se refiere a una composición detergente que comprende una enzima parcialmente dispuesta en el interior de partículas en un gel.

15 Un objetivo consiste en proporcionar un proceso de eliminación de manchas/lavado mejorado que incluye enzimas. También resulta muy difícil proporcionar una mezcla de enzimas en la que la proteasa sea uno de sus componentes principales debido a la hidrólisis de los otros componentes.

20 En consecuencia, la invención proporciona una máquina lavadora que incorpora un dispositivo para tratar secuencialmente tejidos con al menos una primera y una segunda enzimas, comprendiendo el dispositivo una pluralidad de cámaras separadas que contienen respectivamente una primera y una segunda enzimas, desde cuyas cámaras son dispensadas las enzimas secuencialmente, en la que la o las primeras enzimas comprenden una proteasa y la o las segundas enzimas comprenden una o más enzimas de una familia diferente de la primera enzima. El dispositivo comprende con preferencia el cajón de una máquina lavadora.

25 La primera y la segunda enzimas pueden comprender una sola enzima o una mezcla de enzimas.

30 Sorprendentemente, la disposición mencionada anteriormente permite que las enzimas actúen con una mínima interferencia de unas enzimas con otras. Se podría esperar que las proteasas, dosificadas en primer lugar, ataquen a la o las otras enzimas además de a la solución de lavado, impidiendo el tratamiento no proteolítico de las manchas. Sin embargo, el comportamiento de eliminación de manchas de las enzimas debido a la dosificación secuencial, se ha visto mejorado considerablemente.

35 Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefieren las de origen microbiano. Se incluyen las mutantes modificadas químicamente o diseñadas con proteínas. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metalo proteasa, con preferencia una proteasa microbiana alcalina o una proteasa del tipo de la tripsina. Ejemplos de proteasa alcalina son las subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus*, por ejemplo subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en el documento WO 89/06279). Ejemplos de proteasas del tipo de la tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino), y la proteasa *Fusarium* descrita en los documentos WO 89/06270 y WO 94/25583.

45 Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en los documentos WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274. Las enzimas de proteasas preferidas comercialmente disponibles incluyen la Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Dyrazym™, Esperase™, Everlase™, Polarzyme™, y Kannse™, (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™, y FN3™ (Genencor International Inc.).

50 Las lipasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fungicida. Las mutantes modificadas químicamente o las de diseño con proteínas, están incluidas. Ejemplos de lipasas útiles incluyen las lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) según se describe en los documentos EP 258 068 y EP 305 216, o de *H. insolens* según se describe en el documento WO 06/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo a partir de *P. alcaligenes* o de *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp., cepa SD 705 (documentos WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa *Bacillus*, por ejemplo de *B. subtilis* (Dartois et al. (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-260), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992), o *B. pumilus* (WO 91/16422).

60 Otros ejemplos son las variantes de lipasa tales como las descritas en los documentos WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

Las enzimas de lipasa preferidas comercialmente disponibles incluyen la Lipolase™ y Lipolase Ultra™, Lipex™ (Novozymes A/S).

65 Se entiende que las variantes de las enzimas (producidas, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes) están incluidas dentro del significado del término "enzima". Ejemplos de tales variantes de enzimas han sido divulgados,

por ejemplo, en los documentos EP 251.446 (Genencor), WO 91/99345 (Novo Nordisk), EP 525.610 (Solvay) y WO 94/02618 (Gist-Brocades NV).

5 Por consiguiente, los tipos de enzimas que pueden ser incorporadas apropiadamente en gránulos según la invención incluyen las oxidoreductasas (EC 1.-.-.-), transferasas (EC 2.-.-.-), hidrolasas (EC 3.-.-.-), liasas (EC 4.-.-.-), isomerasas (EC 5.-.-.-) y ligasas (EC 6.-.-.-).

10 Las enzimas lipolíticas y de proteasas suministradas secuencialmente, pueden ser dosificadas de manera aislada de otros componentes principales de lavado, o pueden ser dosificadas con tales componentes, pero preferiblemente sin combinar la proteasa con otras enzimas.

15 Las enzimas suministradas secuencialmente utilizadas en la invención pueden ser suministradas junto con uno o más surfactantes y/u opcionalmente otros ingredientes de tal modo que al menos una de las dosis secuenciales sea un limpiador de lavandería completamente funcional y/o una composición de mantenimiento. Tales composiciones utilizadas en la invención pueden estar en forma sólida seca o líquida. La composición puede ser un concentrado para ser diluido, rehidratado y/o disuelto en un solvente, incluyendo el agua, antes de su uso. La composición puede ser también una composición lista para su uso (en uso).

20 La presente invención es adecuada para su uso en aplicaciones de lavado industrial o doméstico de tejidos, aplicaciones de acondicionamiento de tejidos, y aplicaciones tanto para lavado como para acondicionamiento de tejidos (lo que se conoce como composiciones acondicionadoras de lavado). La presente invención puede ser aplicada también a aplicaciones de mantenimiento industrial o doméstico de tejidos sin detergente, por ejemplo aplicaciones en espray.

25 Las composiciones para el lavado de tejidos usadas en la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo en polvo, en polvos conformados en tabletas, líquidas o en barras de detergente sólidas.

30 Otros ingrediente contemplados, incluyendo los surfactantes, hidrotropos, conservantes, rellenos, adyuvantes, agentes complejantes, polímeros, estabilizadores, perfumes en sí mismos, otros ingredientes de detergentes, o combinaciones de uno o más de los mismos, se discuten en lo que sigue.

Las enzimas pueden estar presentes como el único agente reactivo de eliminación de manchas, o pueden estar incorporados otros agentes de eliminación de manchas.

35 Las enzimas adicionales pueden ser dosificadas como parte del proceso global de lavado, proporcionando a éste lo que sigue al proceso inicial de lavado de acuerdo con la invención (es decir, tratamiento con una enzima tal como una o unas proteasas y después con una segunda o más enzimas tal como la o las lipasas).

40 Tales enzimas adicionales (es decir, dosificadas posteriormente) pueden incluir proteasas y lipasas adicionales como en lo que antecede, y también alfa-amilasas, celulasas, peroxidadas/oxidadas, pectato liasas como en lo que antecede, y también alfa amilasas, celulasas, peroxidadas/oxidadas, pectato liasas, y mananasas, o mezclas de las mismas.

45 Los componentes adicionales pueden incluir también cutinasa, clasificada en EC 3.1.1.74. La cutinasa utilizada de acuerdo con la invención puede ser de cualquier origen. Con preferencia, las cutinasas son de origen microbiano, en particular de origen bacteriano, de hongos o de levadura.

50 Las cutinasas son enzimas que están capacitadas para degradar la cutina. En una realización preferida, la cutinasa se deriva de una cepa de *Aspergillus*, en particular de la *Aspergillus oryzae*, una cepa de *Alternaria*, en particular la *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Fusarium*, en particular la *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, o *Fusarium roseum sambucium*, una cepa de *Helminthosporium*, en particular la *Helminthosporium sativum*, una cepa de *Humicola*, en particular la *Humicola insolens*, una cepa de *Pseudomonas*, en particular la *Pseudomonas mendocina* o la *Pseudomonas putida*, una cepa de *Streptomyces*, en particular la *Streptomyces scabies*, o una cepa de *Ulocladium*, en particular la *Ulocladium consortiale*. En una realización más preferida, la cutinasa se extrae de una cepa de *Humicola insolens*, en particular la cepa *Humicola insolens* DSM 1800. La cutinasa de *Humicola insolens* ha sido descrita en el documento WO 96/13580. La cutinasa puede ser una variante, tal como una de las variantes divulgadas en los documentos WO 00/34450 y WO 01/92502. Las variantes de cutinasa preferidas incluyen las variantes listadas en el ejemplo 2 del documento WO 01/92502.

60 Las cutinasas comerciales preferidas incluyen NOVOZYM™ (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

65 Los componentes adicionales pueden incluir también fosfolipasa clasificada como EC 3.1.1.4 y/o EC 3.1.1.32. Según se utiliza en la presente memoria, el término fosfolipasa es una enzima que tiene actividad frente a los fosfolípidos. Los fosfolípidos, tal como la lecitina o la fosfatidilcolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en las posiciones externa (sn-1) e intermedia (sn-2), y esterificado con ácido fosfórico en la tercera posición; el ácido fosfórico, a su vez, puede ser esterificado en un amino-alcohol. Las fosfolipasas son enzimas que participan en la

hidrólisis de fosfolípidos. Se pueden distinguir varios tipos de actividad de fosfolipasa, incluyendo las fosfolipasas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> que hidrolizan un grupo acil graso (en las posiciones sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar un lisofosfolípido; y la lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que puede hidrolizar el resto del grupo acil graso en lisofosfolípido. La fosfolipasa C y la fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacil glicerol o ácido fosfatídico, respectivamente.

El término fosfolipasa incluye enzimas con actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa A (A<sub>1</sub> o A<sub>2</sub>), actividad de fosfolipasa B, actividad de fosfolipasa C o actividad de fosfolipasa D. El término "fosfolipasa A" utilizado en la presente memoria en relación con una enzima de la invención, se pretende que abarque una enzima con actividad de Fosfolipasa A<sub>1</sub> y/o de Fosfolipasa A<sub>2</sub>. La actividad de fosfolipasa puede ser proporcionada por enzimas que tengan también otras actividades, tal como, por ejemplo, una lipasa con actividad de fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa puede ser, por ejemplo, a partir de una lipasa con actividad colateral de fosfolipasa. En otras realizaciones de la invención, la actividad de enzima de fosfolipasa viene proporcionada por una enzima que tiene esencialmente solo actividad de fosfolipasa y en la que la actividad de enzima de fosfolipasa no es una actividad colateral.

La fosfolipasa puede ser de cualquier origen, por ejemplo de origen animal (tal como, por ejemplo, de mamífero), por ejemplo del páncreas (por ejemplo, de páncreas de bovino o de porcino), o de veneno de serpiente o de veneno de abeja. Con preferencia, la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo procedente de hongos filamentosos, levaduras o bacterias, tal como el género o la especie *Aspergillus*, por ejemplo, *A. niger*, *Dictyostelium*, por ejemplo, *D. discoideum*; *Mucor*, por ejemplo, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Rhizopus*, por ejemplo *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, por ejemplo *S. libertiana*; *Trichophyton*, por ejemplo *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, por ejemplo *C. freundii*; *Enterobacter*, por ejemplo *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por ejemplo *E. herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*; *Klebsiella*, por ejemplo *K. pneumoniae*; *Proteus*, por ejemplo *P. vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo *P. stuartii*; *Salmonella*, por ejemplo *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por ejemplo *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo *S. violeceoruber*; *Yersinia*, por ejemplo *Y. enterocolitica*. De ese modo, la fosfolipasa puede ser puede ser un hongo, por ejemplo de la clase *Pyrenomyces*, tal como el género *Fusarium*, tal como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, o una cepa de *F. oxysporum*. La fosfolipasa puede ser también procedente de una cepa de hongo filamentoso comprendido en el género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

Las fosfolipasas preferidas se derivan de una cepa de *Humicola*, especialmente *Humicola lanuginosa*. La fosfolipasa puede ser una variante, tal como una de las variantes divulgadas en el documento WO 00/32758, el cual se incorpora en la presente memoria como referencia. Las variantes de fosfolipasa preferidas incluyen las variantes listadas en el ejemplo 5 del documento WO 00/32758, el cual se incorpora aquí específicamente por referencia. En otra realización preferida, la fosfolipasa es una de las descritas en el documento WO 04/111216, especialmente las variantes listadas en la tabla del ejemplo 1.

Con preferencia, la fosfolipasa se deriva de una cepa de *Fusarium*, especialmente la *Fusarium oxysporum*. La fosfolipasa puede ser la considerada en el documento WO 98/026057 derivada de la *Fusarium oxysporum* DSM 2672, o variantes de la misma.

La fosfolipasa es con preferencia una fosfolipasa A<sub>1</sub> (EC. 3.1.1.32), o una fosfolipasa A<sub>2</sub> (EC. 3.1.1.4).

Ejemplos de fosfolipasas comerciales incluyen LECITASE™ y LECITASE™ ULTRA, YIELSMAX, o LIPOPAN F (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

Las amilasas adecuadas (alfa y/o beta) incluyen las de origen bacteriano o fungicida. Se incluyen las mutantes modificadas químicamente o de diseño con proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, las alfa-amilasas obtenidas a partir de *Bacillus*, por ejemplo una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita con mayor detalle en el documento GB 1.296.839, o las cepas de *Bacillus* sp. divulgadas en los documentos WO 95/026397 o WO 00/060060.

Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en los documentos WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, WO 97/43424, WO 01/066712, WO 02/01035, WO 02/031124 y PCT/DK2005/000469.

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

Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fungicida. Se incluyen las mutantes modificadas químicamente o de diseño con proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo las celulasas de hongos producidas a partir de *Humicola insolens*, *Thielavia terrestres*, *Myceliophthora termopila*, y *Fusarium oxysporum* divulgadas en los documentos US 4.435.307, US 5.648.263, US 5.691.178, US 5.776.757, WO 89/09259, WO 96/029397, y WO

98/012307.

Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tengan beneficios para el cuidado de los colores. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en los documentos EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son las variantes de celulasas tales como las que se describen en los documentos WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5.457.046, US 5.686.593, US 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

Las celulasas comercialmente disponibles incluyen la Celluzyme™, Carezyme™, Endolase™, Renozyme™ (Novozymes A/S), Clazinas™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

Las peroxidases/oxidases adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fungicida. Las mutantes químicamente modificadas o de diseño con proteínas, están incluidas. Ejemplos de peroxidases útiles incluyen peroxidases de *Coprinus*, por ejemplo de *C. cinereus*, y variantes de la misma según se describe en los documentos WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257. Las peroxidases comercialmente disponibles incluyen Guardzyme™ y Novozym™ 5004 (Novozymes A/S).

Ejemplos de pectato liasas incluyen las pectato liasas que han sido clonadas a partir de diferentes géneros bacterianos diferentes tales como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Klesiella* y *Xanthomonas*, así como a partir de *Bacillus subtilis* (Nasser et al., (1993) FEBS Letts. 335: 319-326) y *Bacillus* sp. YA-14 (Kim et al., (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58: 947-949). También se ha descrito la purificación de pectato liasas con actividad máxima en la gama de pH de 8-10 producidas por *Bacillus pumilus* (Dave y Vaughn (1971) J. Bacteriol. 108: 166-174), *B. polymyxa* (Nagel y Vaughn (1961) Arch. Biochem. Biophys. 93: 344-352), *B. stearothermophilus* (Karbassi y Vaughn (1980) Can. J. Microbiol. 26: 377-384), *Bacillus* sp. (Hasegawa y Nagel (1966) J. Food Sci. 31: 838-845) y *Bacillus* sp. RK9 (Kelly y Fogarty (1978) Can. J. Microbiol. 24: 1164-1172). Cualquiera de las anteriores, así como las pectato liasas divalentes independientes del catión y/o termoestables, pueden ser utilizadas en la puesta en práctica de la presente invención. En realizaciones preferidas, la pectato liasa comprende la secuencia de aminoácido de una pectato liasa divulgada en Haffron et al., (1995) Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 331-334 y Henrissat et al., (1995) Plant physiol. 107: 963-976. Las pectato liasas específicamente contempladas son las divulgadas en los documentos WO 99/27083 y WO 99/27084. Otras pectato liasas específicamente contempladas derivadas del *Bacillus licheniformis* han sido divulgadas en la Patente US núm. 6.284.524. Las variantes de pectato liasa específicamente contempladas están descritas en el documento WO 02/006442, especialmente las variantes divulgadas en los ejemplos del documento WO 02/006442.

Ejemplos de pectato liasas alcalinas comercialmente disponibles incluyen BIOFREPT™ y SCOURZYME™ L de Novozymes A/S, Dinamarca.

Ejemplos de mananasas (Ec 3.2.1.78) incluyen las mananasas de origen bacteriano y fungicida. En una realización específica, la mananasa se deriva de una cepa del género de hongo filamentoso *Aspergillus*, con preferencia el *Aspergillus niger* o el *Aspergillus aculeatus* (documento WO 94/25576). El documento 93/24622 divulga una mananasa aislada a partir de *Trichoderma reesei*. Las mananasas han sido aisladas también a partir de varias bacterias, incluyendo los organismos *Bacillus*. Por ejemplo, Talbot et al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56, núm. 11, pp. 3505-3510 (1990) describe una beta-mananasa derivada del *Bacillus stearothermophilus*. Mendoza et al., World J. Microbiol. Biotech., Vol. 10, núm. 5, pp. 551-555 (1994) describe una beta-mananasa derivada del *Bacillus subtilis*.

El documento JP-A-03047076 divulga una beta-mananasa derivada del *Bacillus* sp. El documento JP-A-63056289 describe la producción de una beta-mananasa alcalina, termoestable. El documento JP-A-63036775 se refiere al microorganismo *Bacillus* FERM P-8856 que produce beta-mananasa y beta-manosidasa. El documento JP-A-080551975 divulga beta-mananasas alcalinas procedentes de *Bacillus* sp. AM-001. Una mananasa purificada procedente del *Bacillus amyloliquefaciens* ha sido divulgada en el documento WP 97/11164. El documento WO 91/18974 describe una hemicelulasa tal como una glucanasa, xilanasa o mananasa activa. Se contemplan las mananasas alcalinas de la familia 5 y 26 derivadas del *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus* sp., y *Humicola insolens* divulgados en el documento 99/64619. Especialmente contempladas están las mananasas de *Bacillus* sp a las que se refieren los ejemplos del documento WO 99/64619.

Ejemplos de mananasas comercialmente disponibles incluyen la Mannaway™ disponible en Novozymes A/S, Dinamarca.

Una enzima presente en una composición puede ser estabilizada utilizando agentes estabilizadores convencionales, por ejemplo un poliol tal como el propileno glicol o el glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado del ácido bórico, por ejemplo un borato éster aromático como el ácido 4-formilfenil borónico, y la composición puede estar formulada según se describe, por ejemplo, en los documentos WO 92/19709 y WO 92/19708.

Las composiciones para el lavado de los tejidos pueden comprender un material detergente para el lavado de los

tejidos elegido a partir de surfactante aniónico no jabonoso, surfactantes no iónicos, jabón, surfactantes anfotéricos, surfactantes bipolares, y mezclas de los mismos.

5 Las composiciones detergentes adecuadas para su uso en máquinas lavadoras de tejidos automáticas domésticas o industriales contienen por lo general surfactante aniónico no jabonoso o surfactante no iónico, o combinaciones de los dos en una relación adecuada, según conocen bien los expertos en la materia, opcionalmente junto con jabón.

10 Se encuentran disponibles muchos compuestos activos detergentes adecuados y han sido descritos por completo en la literatura, por ejemplo en "Agentes y Detergentes Activos Superficiales", Volúmenes I y II, de Schwartz, Perry & Berch.

Los surfactantes pueden estar presentes en la composición a un nivel de entre un 0,1% y un 60% en peso.

15 Los surfactantes aniónicos adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen alquil benzeno sulfonato, sulfatos de alquil primarios y secundarios, en particular sulfatos de alquil primarios C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>; alquil éter sulfatos; sulfonatos de olefina; alquil xileno sulfonatos, sulfosuccinatos de dialquil; éter carboxilatos; isotionatos; sarcosinatos; sulfonatos éster de ácido graso y mezclas de los mismos. Se prefieren en general las sales de sodio. Cuando se incluyen, la composición contiene por lo general entre alrededor de un 1% y alrededor de un 50%, con preferencia entre un 10% en peso y un 40% en peso en base a la composición de tratamiento del tejido, de un surfactante aniónico tal como alquilbenzenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, alquil sulfato (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcanosulfonato secundario, metil éster de ácido alfa-sulfo graso, ácido alquil- o alquenil-succínico o jabón. Los surfactantes preferidos son los alquil éter sulfatos y mezclas de surfactantes no iónicos de alquilo alcoxilados ya sea con alquil sulfonatos o ya sea con alquil éter sulfatos.

25 Los alquil éter sulfatos preferidos son los C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub> alquil y tienen 10 moles de etoxilación. Los alquil sulfatos preferidos son alquilbenzeno sulfonatos, en particular alquilbenzeno sulfonatos lineales que tienen una longitud de cadena alquil de C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>. El contra-ión para los surfactantes aniónicos es típicamente sodio, aunque se pueden usar otros contra-iones tales como TEA o amonio. Los materiales surfactantes aniónicos adecuados están disponibles en el mercado como gama "Genapol™" de Clariant.

30 Los surfactantes no iónicos son también conocidos por los expertos en la materia e incluyen alcohol etoxilatos primarios y secundarios, especialmente alcohol alifático C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> etoxilado con un promedio de 1 a 20 moles de óxido de etileno por mol de alcohol, y más especialmente alcoholes alifáticos primarios y secundarios C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub> etoxilados con un promedio de 1 a 10 moles de óxido de etileno por mol de alcohol. Los surfactantes no iónicos, no etoxilados, incluyen poliglicósidos de alquil, monoéteres de glicerol y polihidroxi amidas (glucamida). Se pueden utilizar mezclas de surfactantes no iónicos. Cuando se incluyen en la composición, éstas contienen normalmente entre alrededor de un 0,2% y alrededor de un 40%, con preferencia entre un 1 y un 20% en peso, más preferiblemente entre un 5 y un 15% en peso, de un surfactante no iónico, tal como alcohol etoxilato, nonilfenol etoxilato, alquilpoliglicósido, alquildimetilaminoóxido, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polihidroxi alquil, o derivados N-acil N-alquil glucosamina ("glucamidas").

45 Los surfactantes no iónicos que pueden ser usados incluyen los alcohol etoxilatos primarios y secundarios, especialmente los alcoholes alifáticos C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> etoxilados con un promedio de 1 a 35 moles de óxido de etileno por mol de alcohol, y más especialmente los alcoholes alifáticos primarios y secundarios C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub> etoxilados con un promedio de 1 a 10 moles de óxido de etileno por mol de alcohol.

50 Se pueden emplear niveles más altos de surfactante (hasta casi el 100%) pero esto puede dejar poco espacio en la formulación para los adyuvantes y otros componentes, y puede conducir a un producto pegajoso que requiera un procesamiento especial.

Los hidrotropos pueden ser incluidos en la o las composiciones. El término "hidrotropo" significa en general un compuesto con la capacidad de incrementar las solubilidades, con preferencia las solubilidades acuosas, de ciertos compuestos orgánicos ligeramente solubles. Ejemplos de hidrotropos incluyen el sulfonato de xileno, SCM.

55 La o las composiciones pueden comprender un solvente tal como agua o un solvente orgánico tal como alcohol isopropilo o glicol éteres. Los solventes están presentes típicamente en composiciones líquidas o de gel.

60 La o las composiciones pueden contener un agente quelante metálico, tal como carbonatos, bicarbonatos y sesquicarbonatos. El agente quelante metálico puede ser un estabilizador de blanqueo (es decir, un secuestrante de metal pesado). Los estabilizadores de blanqueo adecuados incluyen etilendiamina tetraacetato (EDTA), dietilendiamina pentaacetato (DTPA), etilendiamina disuccinato (EDDS), y polifosfonatos tales como Dequests (Marca Registrada), etilendiamina tetrametileno fosfonato (EDTMP) y dietilendiamina pentametileno fosfato (DETPMP). En general, los agentes quelantes metálicos no estarán presentes en la parte (a) de la composición dado que se puede perjudicar a la función microbiana si los iones metálicos no están disponibles.

65 Los materiales adyuvantes pueden ser elegidos entre a) materiales secuestrantes del calcio, 2) materiales

precipitantes, 3) materiales de intercambio iónico del calcio, y 4) mezclas de los mismos.

Ejemplos de materiales adyuvantes secuestrantes del calcio incluyen los polifosfatos de metal alcalino tales como el tripolifosfato de sodio, y secuestrantes orgánicos tales como el ácido etileno diamina triacético.

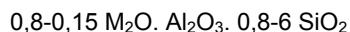
5 Los ejemplos de materiales adyuvantes precipitantes incluyen el ortofosfato de sodio y el carbonato de sodio.

10 Los ejemplos de materiales adyuvantes de intercambio iónico del calcio incluyen los diversos tipos de aluminosilicatos cristalinos o amorfos insolubles en agua, por ejemplo la zeolita A, la zeolita B (conocida también como zeolita P), la zeolita C, la zeolita X, la zeolita Y, y también la zeolita de tipo P, según se describe en el documento EP-A-0.384.070.

15 La o las composiciones pueden contener también un 0-65% de un adyuvante o un agente complejante, tal como el ácido etilendiamina-tetraacético, el ácido dietilenoetriamino-pentaacético, el ácido alquil- o alquenil-succínico, el ácido nitrilotriacético, u otros adyuvantes mencionados en lo que sigue. Muchos de los adyuvantes son agentes estabilizadores de blanqueo en virtud de su capacidad para complejar iones metálicos.

20 Cuando se encuentra presente el adyuvante, la o las composiciones pueden contener adecuadamente menos de un 20% en peso, con preferencia menos de un 10% en peso, y más preferiblemente menos de un 10% en peso de adyuvante de detergencia.

25 La o las composiciones pueden contener como adyuvante un aluminosilicato cristalino, con preferencia un aluminosilicato de metal alcalino, más preferentemente un aluminosilicato de sodio. Éste se encuentra típicamente presente a un nivel menor de un 15% en peso. Los aluminosilicatos son materiales que tienen la fórmula general:



30 donde M es un catión monovalente, con preferencia sodio. Estos materiales contienen algo de agua enlazada, y se requiere que tengan una capacidad de intercambio de ion calcio de al menos 50 mg de CaO/g. Los aluminosilicatos de sodio preferidos contienen 1,5-3,5 unidades de SiO<sub>2</sub> en la fórmula anterior. Éstos pueden ser preparados fácilmente por reacción entre silicato de sodio y aluminato de sodio, según ha sido ampliamente descrito en la literatura. La relación de surfactantes respecto al aluminosilicato (cuando está presente) es con preferencia mayor de 5:2, más preferiblemente mayor de 3:1.

35 Alternativamente, o adicionalmente a los adyuvantes de aluminosilicato, se pueden usar adyuvantes fosfato. En esta técnica, el término "fosfato" abarca las especies difosfato, trifosfato, y fosfonato. Otras formas de adyuvantes incluyen los silicatos, tal como los silicatos solubles, metasilicatos, silicatos en capas (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst).

40 Para formulaciones de bajo coste, se puede emplear carbonato (incluyendo el bicarbonato y el sesquicarbonato) y/o citrato como adyuvantes.

45 La composición puede comprender uno o más polímeros. Algunos ejemplos son la carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etileno glicol), poli(vinilo alcohol), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como los poliácridatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico, y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

50 Las composiciones detergentes modernas emplean típicamente polímeros como los llamados "inhibidores de transferencia de tinte". Éstos impiden la migración de tintes, especialmente durante tiempos largos de remojo. Se pueden usar cualesquiera agentes de inhibición de transferencia de tinte adecuados de acuerdo con la presente invención. En general, tales agentes de inhibición de transferencia de tinte incluyen polímeros de polivinil pirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, manganeso ftalocianina, peroxidasa, y mezclas de los mismos.

55 Se prefieren los polímeros DTI, ligantes de tinte, que contienen nitrógeno. De estos polímeros y copolímeros de aminas cíclicas, se prefieren la vinil pirrolidona, y/o el vinil imidazol.

60 Los polímeros de N-óxido de poliamina adecuados para su uso en la presente invención, contienen unidades que tienen la siguiente fórmula estructural: R-A<sub>x</sub>-P; en la que P es una unidad polimerizable a la que puede estar unido un grupo N-O, o el grupo N-O puede formar parte de la unidad polimerizable; A es una de las siguientes estructuras: -NC(O)-, -C(O)O-, -S-, -O-, -N=; x es 0 ó 1; y R es un grupo alifático, aromático, heterocíclico o alicíclico etoxilado, o una combinación de los mismos, al que puede estar unido el nitrógeno del grupo N-O o el grupo N-O es parte de esos grupos, o el grupo N-O puede estar unido a ambas unidades. Los N-óxidos de poliamina preferidos son aquellos en los que R es un grupo heterocíclico, tal como piridina, pirrol, imidazol, pirrolidina, piperidina y derivados de los mismos. El grupo N-O puede estar representado por las siguientes estructuras generales: N(O) (R')<sub>0-3</sub>, o =N(O) (R')<sub>0-1</sub>, en las que cada R' representa independientemente un grupo alifático, aromático, heterocíclico o alicíclico, o una combinación de los mismos; y el nitrógeno del grupo N-O puede estar unido a, o formar parte de,

cualquiera de los grupos mencionados anteriormente. La unidad de óxido de amina de los N-óxidos de poliamina tiene un  $pK_a < 10$ , con preferencia un  $pK_a < 7$ , más preferentemente un  $pK_a < 6$ .

5 Se puede utilizar cualquier estructura de polímero siempre que el polímero de óxido de amina formado sea soluble en agua, y tenga propiedades de inhibición de transferencia de tinte. Ejemplos de estructuras poliméricas adecuadas son los polivinilos, polialquilenos, poliésteres, poliéteres, poliamidas, poliimidazoles, poliacrilatos y mezclas de los mismos. Estos polímeros incluyen copolímeros aleatorios o de bloque en los que un tipo de monómero es un N-óxido de amina y el otro tipo de monómero es un N-óxido. Los polímeros de N-óxido de amina tienen típicamente una relación de amina respecto al óxido de N-amina de 10:1 a 1:1.000.000. Sin embargo, el número de grupos de  
10 óxido de amina presentes en el polímero de óxido de poliamina puede ser modificado mediante copolimerización apropiada o mediante un grado apropiado de N-oxidación. Los óxidos de poliamina pueden ser obtenidos en casi cualquier grado de polimerización. Típicamente, el peso molecular medio está dentro de la gama de 500 a 1.000.000; más preferiblemente de 1.000 a 500.000; más preferiblemente de 5.000 a 100.000. Esta clase preferida de materiales se menciona en la presente memoria como "PVNO". Un N-óxido de poliamina preferido es el poli(4-vinilpiridina-N-óxido) que tiene un peso molecular medio de alrededor de 50.000 y una relación de amina respecto a N-óxido de amina de alrededor de 1:4.

También se prefieren los copolímeros de los polímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol (como una clase, mencionada como "PVPVI"). Con preferencia, la PVPVI tiene un peso molecular medio comprendido en la gama de  
20 5.000 a 1.000.000, más preferiblemente de 5.000 a 200.000, y más preferiblemente de 10.000 a 20.000, según se determina mediante dispersión de luz tal y como describe Barth, et al., en Chemical Analysis, Vol. 113. "Métodos Modernos de Caracterización de Polímeros". Los copolímeros PVPVI preferidos tienen típicamente una relación de peso molecular del N-vinilimidazol respecto a la N-vinilpirrolidona entre 1:1 y 0,2:1, más preferiblemente entre 0,8:1 y 0,3:1, más preferiblemente entre 0,61:1 y 0,4:1. Estos copolímeros pueden ser tanto lineales como ramificados. Los  
25 polímeros PVPVI adecuados incluyen el Sokalan<sup>(TM)</sup> HP56, disponible comercialmente en BASF, Ludwigshafen, Alemania.

También se prefieren como agentes de inhibición de transferencia de tinte los polímeros de polivinilpirrolidona ("PVP") que tengan un peso molecular medio de entre alrededor de 5.000 y alrededor de 400.000, con preferencia  
30 entre alrededor de 5.000 y alrededor de 200.000, y más preferentemente entre alrededor de 5.000 y alrededor de 50.000. Los PVPs han sido divulgados, por ejemplo, en los documentos EP-A-262.897 y EP-A-256.696. Los polímeros de PVP adecuados incluyen Sokalan<sup>(TM)</sup> HP50, disponible comercialmente en BASF. Las composiciones que contienen PVP pueden contener también polietileno glicol ("PEG") que tenga un peso molecular medio de entre alrededor de 500 y alrededor de 100.000, con preferencia de alrededor de 1.000 a alrededor de 10.000. Con  
35 preferencia, la relación de PEG respecto a PVP sobre una base de ppm, suministrada en soluciones de lavado, es de entre alrededor de 2:1 alrededor de 50:1, y más preferentemente de alrededor de 3:1 a alrededor de 10:1.

También se consideran adecuados como agentes de inhibición de transferencia de tinte los comprendidos en la clase de polímeros de polietilenoimina modificados, tal como los que se describen por ejemplo en el documento WO-  
40 A-0005334. Estos polímeros de polietilenoimina modificados son poliaminas modificadas, solubles o dispersibles en agua. Las poliaminas modificadas han sido además divulgadas en los documentos US-A-4.548.744; US-A-4.597.898; US-A-4.877.896; US-A-4.891.160; US-A-4.976.879; US-A-5.415.807; GB-A-1.537.288; GB-A-1.498.520; DE-A-28 29022, y JP-A-06313271.

45 Con preferencia, la o las composiciones utilizadas en la presente invención comprenden un agente de inhibición de transferencia de tinte seleccionado entre N-óxido polivinilpirridina (PVNO), polivinil pirrolidona (PVP), polivinil imidazol, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol (PVPVI), copolímeros de los mismos, y mezclas de los mismos.

50 La cantidad de agente de inhibición de transferencia de tinte en la o las composiciones conformes a la presente invención podrá estar comprendida entre un 0,01 y un 10%, con preferencia entre un 0,02 y un 5%, más preferiblemente entre un 0,03 y un 2,0% en peso de la composición.

La o las composiciones pueden contener también otros ingredientes detergentes, tal como, por ejemplo, acondicionadores del tejido que incluyan arcillas, reforzadores de la espumación, supresores de aguas jabonosas (anti-espumantes), agentes anticorrosión, agentes de suspensión de mancha, agentes de anti-redeposición de mancha, tintes adicionales, agentes anti-microbianos, abrillantadores ópticos, inhibidores de decoloración, o perfumes.

60 El cajón dispensador de la máquina lavadora automática puede ser utilizado para dosificar secuencialmente las enzimas, por ejemplo utilizando la cámara de pre-lavado para dosificar la o las proteasas y la cámara principal para dosificar la o las lipasas.



**Ejemplos de realizaciones no limitativas de la invención**

Ejemplo 1

5 Evaluación de lavado de la proteasa y una lipasa en la eliminación de manchas de hierba (tergotómetro)

El comportamiento de lavado fue evaluado lavando muestras de tela de poliéster manchadas de hierba (wfk30A) en una solución detergente con una proteasa (Savinase 12TXT) y una lipasa (Lipex 100T o lipolasa 100T) en tratamientos de enzima simple, combinación y secuencia (2 lavados).

10 Preparación de las muestras de tela manchadas de hierba: Se prepararon manualmente manchas relevantes para el usuario, frotando vigorosamente montones de césped sobre muestras de tela de tejido de algodón, para crear manchas homogéneas verde oscuro.

15 Lavado: las muestras de tela manchadas de hierba (7 x 7 cm) fueron colocadas en cubas del tergotómetro con los componentes de la formulación modelo (tabla 1) en 1 l de agua desmineralizada y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, con agitación mecánica. En el instante t = 15 minutos, se detuvo la agitación, todas las manchas fueron enjuagadas con 1 l de agua desmineralizada, y las muestras con manchas fueron transferidas a segundas cubas de lavado con enzima según la secuencia. La agitación continuó durante 15 minutos más. Las muestras de tela fueron aclaradas en agua del grifo, y extendidas y se dejaron secar en la oscuridad, a temperatura ambiente durante toda la noche.

25 Evaluación: Se midió la remisión de color de las muestras de tela a 410 nm utilizando un espectrofotómetro de remisión Hunterlab UltraScan VIS. Los resultados se han expresado como:

$$\text{remisión delta} = (R_{\text{después del lavado}} - R_{\text{antes del lavado}})_{\text{enzima}} - (R_{\text{después del lavado}} - R_{\text{antes del lavado}})_{\text{control}},$$

en la que R es la remisión a 410 nm utilizando los valores CIE L\*a\*b\* (CIELAB) generados (Figura 1).

30 Tabla 1. Componentes de la formulación.

NaCl	0,05 M
Ca <sup>2+</sup>	6 FH
Regulador CAPS, pH 10	20 mM
Surfactante (80:20 LAS:EO7, p/p)	0,5 g/l
Enzima (total)	1 mg/l

Tabla 2. Comportamiento de lavado de la savinasa, savinasa y lipasa, y savinasa seguida de lipasa, sobre el algodón y a bajo FH (FH6) en el tergotómetro. Todas las manchas fueron lavadas con surfactante. Concentración total de proteína de la enzima = 1 µg/ml.

Enzima	Control d[DE]menos
Savinasa	0,82
Savinasa + Lipex	0,68
Savinasa + Lipolasa	1,61
Savinasa seguida de Lipex	2,81
Savinasa seguida de Lipolasa	3,46

35 La tabla muestra cómo la dosificación secuencial de una proteasa seguida de una lipasa proporciona una eliminación de las manchas muy mejorada.

Ejemplo 2

40 Evaluación de Lavado de la proteasa y una lipasa en la eliminación de manchas de hierba (microvaloración)

45 El comportamiento de lavado fue evaluado lavando tela de prueba de algodón con manchas de hierba en una solución detergente con una proteasa (Savinase 12TXT) y una lipasa (Lipex 100T) en tratamientos con enzima simple, combinación y secuencia (2 lavados).

Preparación de la tela de muestra con manchas de hierba: Se prepararon manualmente manchas relevantes para el usuario frotando vigorosamente hierba mezclada (relación en agua 3:1), previamente filtrada a través de un tejido de

poliéster, sobre tejido de algodón utilizando un cepillo de uñas.

5 Lavado: Las telas de prueba con manchas de hierba fueron colocadas en placas de microvaloración con los componentes de la formulación modelo (tabla 1) en 200 µl de agua desmineralizada, y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C sobre un agitador orbital, con agitación (1150 rpm). Esta vez se probó la dureza del agua baja (FH60) y alta (FH40). En el instante t = 15 minutos, se detuvo la agitación, y se expuso a la segunda solución de enzima según la secuencia. La agitación continuó durante otros 15 minutos. Las muestras de tela fueron enjuagadas con agua del grifo dos veces, y se dejaron secar en oscuridad, a 45 °C durante al menos 3 horas.

10 Evaluación: Se midió la remisión de color de las muestras de tela a 410 nm utilizando un espectrofotómetro de remisión de lecho plano. Los resultados se han expresado como:

$$\text{remisión delta} = (R_{\text{después del lavado}} - R_{\text{antes del lavado}})_{\text{enzima}} - (R_{\text{después del lavado}} - R_{\text{antes del lavado}})_{\text{control}}$$

15 en la que R es la remisión a 410 nm utilizando los valores CIE L\*a\*b\* (CIELAB) generados (tablas 3 y 4).

Savinasa	15,39	16,12
Savinasa + Lipasa	14,17	17,95
Savinasa seguida de Lipasa	20,40	21,10

20 Tabla 3. Comportamiento de lavado de la savinasa, savinasa y lipasa, y savinasa seguida por lipasa, sobre algodón y a bajo FH (FH6) en placas de microvaloración. Todas las manchas fueron lavadas con surfactante. Concentración total de proteína de enzima = 1 ó 40 µg/ml. S-L, savinasa seguida por lipasa.

Savinasa	6,66	12,19
Savinasa + Lipasa	6,52	10,72
Savinasa seguida de Lipasa	8,90	13,94

25 Tabla 4. Comportamiento de lavado de la savinasa, savinasa y lipasa, y savinasa seguida de lipasa, sobre algodón y a alto FH (FH40) en placas de microvaloración. Todas las manchas fueron lavadas con surfactante. Concentración total de proteína de enzima = 1 ó 40 µg/ml. S-L, saviasa seguida de lipasa.

Se ha de entender, por supuesto, que no se pretende que la invención quede limitada a los detalles de la realización anterior, los cuales han sido descritos únicamente a título de ejemplo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Una máquina lavadora que incorpora un dispositivo de tratamiento secuencial para tratar secuencialmente tejidos con al menos una primera y una segunda enzimas, comprendiendo el dispositivo una pluralidad de cámaras separadas que contienen respectivamente primeras y segundas enzimas, a partir de cuyas cámaras son dispensadas secuencialmente las enzimas, caracterizada porque la o las primeras enzimas comprenden una proteasa y la o las segundas enzimas comprenden una o más enzimas de una familia diferente a la de las primeras enzimas.
- 10 2.- Una máquina lavadora de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la segunda enzima comprende una o más enzimas lipolíticas.
- 3.- La máquina lavadora de la reivindicación 1 ó 2, en la que el dispositivo de tratamiento secuencial comprende el cajón de una máquina lavadora.