

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 672**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2009** **E 09756715 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014** **EP 2358858**

54 Título: **Agente de lavado y limpieza que contiene proteasas de Bacillus pumilus**

30 Prioridad:

27.11.2008 DE 102008059447

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

12.06.2014

73 Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)

Henkelstrasse 67

40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

SIEGERT, PETRA;

SPITZ, ASTRID y

MAURER, KARL-HEINZ

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 467 672 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

Agente de lavado y limpieza que contiene proteasas de *Bacillus pumilus*

- 5 La presente solicitud de patente se refiere a agentes de lavado y limpieza que contienen una proteasa de *Bacillus pumilus*. Además, la solicitud se refiere a procedimientos de limpieza en los que se emplean estos agentes así como a usos de estos agentes. Además, la solicitud se refiere a procedimientos de limpieza mediante aplicación de estas proteasas, así como al uso de estas proteasas con fines de lavado y limpieza.
- 10 Para agentes de lavado y limpieza hasta ahora se emplean, preferentemente, proteasas del tipo subtilisina. Las proteasas empleadas en los agentes de lavado o limpieza conocidos por el estado de la técnica proceden originalmente de microorganismos, por ejemplo, de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola* o *Pseudomonas* y/o se producen según procedimientos biotecnológicos en sí conocidos por microorganismos adecuados, por ejemplo, por hospedadores transgénicos de expresión de los géneros *Bacillus* o por hongos filamentosos.
- 15 Son ejemplos de esto las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa de *Bacillus lentus*, en particular de *Bacillus lentus* DSM 5483, la subtilisina DY y las enzimas a asignar a las subtilasas, sin embargo, ya no a las subtilisinas en el sentido más estricto termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7. Otras proteasas que se pueden usar son, por ejemplo, las enzimas que se pueden obtener con el nombre comercial
- 20 Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym, Natalase®, Kannase® y Ovozyme® de la empresa Novozymes, con el nombre comercial Purafect®, Purafect® OXP, Purafect® Prime y Properase® de la empresa Genencor, con el nombre comercial Protosol® de la empresa Advanced Biochemicals Ltd., Thane, India, con el nombre comercial Wuxi® de la empresa Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, con el nombre comercial Proleather® y Protease P® de la empresa Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japón y con la denominación proteinasa K-16 de la empresa Kao Corp., Tokio, Japón.
- 25 Además, por el estado de la técnica son conocidas proteasas de *Bacillus pumilus*. En la solicitud internacional WO2007/131656 está desvelada, por ejemplo, una proteasa de *Bacillus pumilus* y también está propuesta como ingrediente para agentes de lavado y limpieza.
- 30 Sin embargo, ni mucho menos cualquier proteasa aporta en efecto un rendimiento de limpieza satisfactorio en un agente de lavado. Más bien ocurre el caso de que incluso proteasas que proceden de organismos filogenéticamente muy relacionados tales como, por ejemplo, diferentes cepas de *Bacillus pumilus*, en agentes de lavado o limpieza presentan rendimientos de limpieza muy diferentes. Por tanto, muchas proteasas no son adecuadas para el empleo
- 35 en agentes de lavado o limpieza.
- Una desventaja de agentes de lavado y limpieza que contienen proteasa con proteasas del estado de la técnica es que las proteasas contenidas no presentan una actividad proteolítica satisfactoria, en particular a temperaturas bajas, por ejemplo entre 10 °C y 50 °C, en particular entre 10 °C y 40 °C o entre 20 °C y 40 °C y, por tanto, el agente
- 40 de lavado o limpieza no muestra un rendimiento óptimo de limpieza, en particular no en el respectivo intervalo de temperaturas y en particular no con ensuciamientos sensibles a proteasa. Por tanto, existe la necesidad de hallar nuevas proteasas, en particular nuevas proteasas microbianas, para el empleo en agentes de lavado y limpieza y facilitar nuevos agentes de lavado y limpieza correspondientes que contengan tales proteasas.
- 45 Por lo tanto, la presente invención se basa en el objetivo de facilitar agentes de lavado o limpieza que presenten un rendimiento de limpieza mejorado, en particular en relación con ensuciamientos que sean sensibles a la degradación por proteasas. Otro objetivo de la invención es facilitar agentes de lavado o limpieza que presenten un rendimiento mejorado de limpieza a temperaturas menores, en particular entre 10 °C y 50 °C y preferentemente entre 10 °C y 40 °C, en particular en relación con ensuciamientos que sean sensibles a la degradación por proteasas. Estos agentes
- 50 de lavado o limpieza, en particular en un intervalo de temperaturas entre 10 °C y 50 °C y preferentemente entre 10 °C y 40 °C, deberían mostrar una eliminación mejorada de al menos un ensuciamiento que sea sensible a la degradación por una proteasa. Preferentemente, los agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención muestran una eliminación mejorada de varios ensuciamientos. En particular, estos agentes de lavado o limpieza deberían contener proteasas y, de forma particularmente preferente, proteasas de origen natural que se caracterizan
- 55 por que su aportación al rendimiento de limpieza de un agente que contiene la proteasa al menos se aproxima y, de forma ideal, supera a la aportación al rendimiento de limpieza del agente de una enzima proteolítica establecida para este fin.
- Por tanto, un objeto de la invención es un agente de lavado o limpieza que comprende una proteasa que comprende
- 60 una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 3 de al menos el 97,5 % y, cada vez más preferentemente, de al menos el 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % y, de forma muy particularmente preferente, el 100 %, así como al menos otro ingrediente de agente de lavado. Sorprendentemente, se ha comprobado que una proteasa de este tipo se puede emplear ventajosamente en un
- 65 agente de lavado o limpieza y confiere al mismo un rendimiento de limpieza ventajoso, sobre todo también a temperaturas bajas, por ejemplo entre 10 °C y 50 °C, en particular entre 10 °C y 40 °C o entre 20 °C y 40 °C. Por

tanto, un agente de este tipo posibilita una eliminación mejorada de al menos un, preferentemente de varios ensuciamientos sensibles a proteasa sobre materiales textiles y/o superficies duras, por ejemplo vajilla.

La proteasa contenida en un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención, tal como se puede comprender con ayuda de los ejemplos, se puede obtener del sobrenadante de cultivo de una cepa de *Bacillus* que está identificada por la DSMZ (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) como una cepa de *Bacillus pumilus*. La cepa o la muestra de suelo que contiene la misma procede de Minneapolis, EE.UU. Con el fin de la reproducibilidad se depositó, de acuerdo con el Tratado de Budapest, un plásmido que contiene la secuencia de ácido nucleico de esta proteasa en la DSMZ con el número de depósito DSM 21890.

Una proteasa contenida en un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención presenta una actividad proteolítica, es decir, tiene capacidad para la hidrólisis de enlaces peptídicos de un polipéptido o una proteína. Por tanto, es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos y, por ello, está en disposición de escindir péptidos o proteínas, en particular una subtilisina. En el sentido de la presente invención, las enzimas, proteínas, fragmentos y derivados, a menos que se tengan que mencionar explícitamente como tales, se compilan en el concepto general proteínas o polipéptidos, ya que una proteína es un polipéptido.

La proteasa contenida en un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención, a causa de su actividad proteolítica y sus demás propiedades, en particular en relación con su estabilidad frente a tensioactivos y/o blanqueadores y/o su perfil de temperatura y/o su perfil de pH, es adecuada para la aplicación en agentes de lavado y limpieza. Sorprendentemente, de este modo ya en su forma de tipo natural realiza una buena aportación al rendimiento de limpieza de un agente de lavado o limpieza que contiene la proteasa, que se aproxima a la aportación al rendimiento de limpieza del agente de una enzima proteolítica establecida para este fin y que, incluso, supera la misma en diferentes ensuciamientos. Esto es tanto más sorprendente en cuanto que en bacterias de cepas bacterianas filogenéticamente relacionadas, en particular distintas cepas de *Bacillus pumilus*, están presentes proteasas diferentes en relación con su capacidad de empleo en agentes de lavado o limpieza, es decir, ni mucho menos todas las proteasas de *Bacillus pumilus* son aptas para esto. Las proteasas empleadas en agentes de acuerdo con la invención son adecuadas para esto y, en particular con aplicación de un agente de lavado y limpieza que contiene las mismas, causan una eliminación satisfactoria de uno o varios ensuciamientos que contienen proteína, en particular en los intervalos de temperaturas que se han mencionado anteriormente. Por tanto, en las exigentes condiciones de aplicación de agentes de lavado y limpieza poseen una actividad proteolítica suficientemente elevada para degradar ensuciamientos que contienen proteína en las condiciones de empleo del agente de lavado o limpieza. Resultan condiciones exigentes de aplicación en agentes de lavado y limpieza, en particular, a causa de la presencia de uno o varios ingredientes adicionales en tales agentes y en el baño de lavado formado por los mismos durante el proceso de lavado, tales como blanqueadores, activadores de blanqueo, tensioactivos, sustancias ayudantes (soporte) y/o a causa del valor del pH de tales agentes y del baño de lavado formado por los mismos durante el proceso de lavado y/o a causa de la fuerza iónica y/o la temperatura del baño de lavado durante el proceso de lavado. De acuerdo con la invención, por rendimiento de limpieza se entiende el rendimiento de aclaramiento de un agente de lavado o limpieza de ensuciamientos, en particular de ensuciamientos sensibles a proteasa y, entre estos, en particular ensuciamientos de ropa sensibles a proteasa. El rendimiento de limpieza preferentemente se establece tal como se indica más adelante.

Numerosas proteasas y, en particular, subtilisinas se forman como las denominadas preproteínas, es decir, junto con un propéptido y un péptido señal, consistiendo la función del péptido señal habitualmente en garantizar la secreción de la proteasa de la célula que la produce al periplasma o al medio que circunda a la célula y siendo el propéptido habitualmente necesario para el plegado correcto de la proteasa. El péptido señal y el propéptido por norma general son la parte N-terminal de la preproteína. El péptido señal se escinde, en condiciones naturales, por una peptidasa señal de la proteasa restante. A continuación se realiza el correcto plegado definitivo de la proteasa respaldado por el propéptido. La proteasa entonces está en su forma activa y escinde el propio propéptido. Después de la escisión del propéptido, entonces la proteasa madura (mature), en particular la subtilisina, ejerce su actividad catalítica sin los aminoácidos N-terminales existentes de forma original.

Para aplicaciones técnicas, a causa de su actividad enzimática, las proteasas maduras (mature), es decir, las enzimas procesadas después de su producción, se prefieren frente a las preproteínas. Las proteasas se pueden modificar por las células que las producen después de la producción de la cadena polipeptídica, por ejemplo, mediante enlace de moléculas de azúcar, formulaciones, aminaciones, etc. Tales modificaciones se denominan modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones post-traduccionales pueden ejercer, sin embargo, no tienen que hacerlo, una influencia sobre la función de la proteasa.

La secuencia de ácido nucleico de una proteasa contenida en un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención está indicada en la SEC ID N°: 1. Este ácido nucleico codifica una proteasa que presenta una división típica de las subtilisinas en péptido señal, propéptido y proteasa madura (mature). La proteína de longitud completa está indicada en la SEC ID N°: 2 y la proteasa madura (mature), en la SEC ID N°: 3. Con esto se quiere decir la proteína madura realmente activa, debido a que la misma ejerce la función técnicamente relevante. Por tanto, los agentes de lavado o limpieza particularmente preferentes de acuerdo con la invención contienen las proteasas

maduras activas. Estas presentan un peso molecular entre 25 y 30 kD (kilodalton), en particular 27 kD, establecido mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Para la proteasa de acuerdo con la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 2 se llevó a cabo un análisis de secuencia así como una comparación de secuencias con secuencias conocidas de proteínas de los bancos de datos accesibles de forma general UniProtKB y/o Swiss-Prot (compárese con UniProtKB, EMBL Outstation - European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, Reino Unido; <http://www.uniprot.org>) y/o GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.), para establecer las proteínas con la mayor similitud. Esta comparación de secuencias se realizó con ayuda del algoritmo BLAST establecido en el estado de la técnica y empleado habitualmente (compárese, por ejemplo, con Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, pág. 3389-3402). Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA.

La comparación con los bancos de datos mencionados proporcionó una entrada de banco de datos que tiene una identidad del 100 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 2. Es la entrada de banco de datos B2FUW7 (UniProtKB/TrEMBL (B2FUW7_BACPU)) o la entrada de banco de datos AM748727 (Genbank) o su traducción CAO03040.1 ("*Bacillus pumilus* sapB gene for serine alkaline protease preproprotein"). Esta entrada difiere en una posición de aminoácido de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 3 de la proteasa madura (mature).

Además, la entrada contig00263 de la secuenciación del genoma de *Bacillus pumilus* F036B (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, EE.UU., compárese con http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial/microbial-detail.xsp?project_id=141) desvela asimismo una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 100 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 2.

Sin embargo, de estas entradas de banco de datos ni se obtiene un agente de lavado o limpieza que contenga una proteasa de este tipo o una proteasa similar a esta proteasa, ni las entradas contienen informaciones acerca de la aplicabilidad ventajosa de proteasas correspondientes en agentes de lavado o limpieza.

La determinación de la identidad de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos se realiza mediante una comparación de secuencias. Mediante una comparación de este tipo con enzimas conocidas, que están depositadas, por ejemplo, en bancos de datos accesibles de forma general, se puede deducir a partir de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos también la actividad enzimática de una enzima considerada. Esta se puede modificar cualitativa o cuantitativamente por otras zonas de la proteína que no intervienen en la reacción en sí. Esto podría afectar, por ejemplo, a la estabilidad enzimática, la actividad, las condiciones de reacción o la especificidad de sustrato.

Una comparación de este tipo ocurre asignándose unas a otras sucesiones similares en las secuencias de nucleótidos (o también secuencias de aminoácidos). Una asignación tabulada de las respectivas posiciones se denomina alineamiento. En el análisis de secuencias de nucleótidos se tienen que tener en cuenta, a su vez, ambas cadenas complementarias y, respectivamente, las tres posibles fases de lectura; asimismo la degeneración del código genético y el uso específico de organismo de los codones (uso de codones). Habitualmente se crean comparaciones de secuencias y alineamientos a través de programas informáticos. Se utilizan con frecuencia, por ejemplo, Clustal (compárese por ejemplo con Chenna *et al.* (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500) o T-Coffee (compárese por ejemplo con Notredame *et al.* (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) así como BLAST o FASTA para la búsqueda en bancos de datos, o programas que se basan en estos programas o algoritmos. En la presente solicitud de patente se crearon comparaciones de secuencias y alineamientos con el programa informático Vector ANTI® Suite 7.0 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EE.UU.) con los parámetros por defecto predefinidos.

Una comparación de este tipo permite también una afirmación acerca de la similitud de las secuencias comparadas. Habitualmente se indica en porcentaje de identidad, es decir, la parte de los nucleótidos idénticos o restos de aminoácidos en los mismos o un alineamiento de posiciones correspondientes entre sí. El término más amplio de la homología incluye en la consideración, en el caso de secuencias de aminoácidos, sustituciones conservativas de aminoácidos, es decir, aminoácidos con actividad química similar, ya que los mismos dentro de la proteína ejercen, la mayoría de las veces, actividades químicas similares. Por tanto, la similitud de las secuencias comparadas se puede indicar también como porcentaje de homología o porcentaje de similitud. Las indicaciones de identidad y/u homología se pueden realizar acerca de polipéptidos o genes enteros o solo acerca de zonas individuales. Por tanto, las zonas homólogas o idénticas de distintas secuencias de ácido nucleico o aminoácidos están definidas por coincidencias en las secuencias. Tales zonas presentan frecuentemente funciones idénticas. Pueden ser pequeñas y comprender solo pocos nucleótidos o aminoácidos. Con frecuencia, las zonas tan pequeñas ejercen funciones esenciales para la actividad global de la proteína. Por tanto, puede ser razonable que las coincidencias de

secuencias se refieran solo a zonas individuales, dado el caso pequeñas. A menos que se indique de otro modo, no obstante, las indicaciones de identidad u homología en la presente solicitud se refieren a la longitud completa de la secuencia, respectivamente indicada, de ácido nucleico o aminoácidos.

- 5 Se comprobó que un agente de lavado y limpieza con una proteasa preferida de acuerdo con la invención presenta un rendimiento aumentado de limpieza frente a un agente sin proteasa y consigue un rendimiento de limpieza muy bueno en relación con ensuciamientos sensibles a proteasa.

10 En otra forma de realización preferente de la invención, un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención está caracterizado por que su rendimiento de limpieza se corresponde al menos con el de un agente de lavado o limpieza que incluye una proteasa de acuerdo con la SEC ID N° 3 y/o que incluye una proteasa de acuerdo con la SEC ID N° 4 y/o que incluye una proteasa que se corresponde con la proteasa de *Bacillus pumilus* de acuerdo con el documento WO2007/131656, determinándose el rendimiento de limpieza en un sistema de lavado que contiene un agente de lavado con una dosificación entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de baño de lavado así como la proteasa, empleándose las proteasas a comparar con la misma actividad y determinándose el rendimiento de limpieza frente a uno o varios de los ensuciamientos sangre-leche/tinta china sobre algodón, huevo entero/pigmento (huevo completo/negro de humo) sobre algodón, leche chocolateada/negro de humo sobre algodón, aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón, hierba sobre algodón y cacao sobre algodón, en particular frente a uno o varios de los ensuciamientos

- 20 - sangre-leche/tinta china sobre algodón: producto N° C-05 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B. V. Vlaardingen, Países Bajos
 - huevo entero/pigmento (huevo completo/negro de humo) sobre algodón: producto N° 10N disponible en la empresa wfk Testgewebe GmbH; Brüggem-Bracht, Alemania o el producto C-S-37 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B. V. Vlaardingen, Países Bajos
 25 - leche chocolateada/negro de humo sobre algodón: producto N° C-03 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B. V. Vlaardingen, Países Bajos
 - aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón: producto N° PC-10 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B. V. Vlaardingen, Países Bajos
 30 - hierba sobre algodón: producto N° 164 disponible en la empresa Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza
 - cacao sobre algodón: producto N° 112 disponible en la empresa Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza

35 mediante medición del grado de blanco de los materiales textiles lavados, realizándose el proceso de lavado durante al menos 30 minutos, opcionalmente 60 minutos, a una temperatura de 40 °C y presentando el agua una dureza del agua entre 15,5 y 16,5° (dureza alemana). De acuerdo con la invención, las expresiones huevo completo/negro de humo o huevo entero/pigmento en relación con los ensuciamientos se han de considerar equivalentes y correspondientes entre sí.

40 Un agente de lavado líquido preferente para un sistema de lavado de este tipo está compuesto del siguiente modo (todas las indicaciones en porcentaje en peso): 0,3-0,5 % de goma xantana, 0,2-0,4 % de antiespumante, 6-7 % de glicerol, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (sulfato de éter de alcohol graso), 24-28 % de tensioactivos no iónicos, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato sódico (dihidrato), 2-4 % de carbonato de sodio, 14-16 % de ácidos grasos de nuez de coco, 0,5 % de HEDP (ácido 1-hidroxietan-(1,1-di-fosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de agente de aclaramiento óptico, 0-0,001 % de colorante, resto agua desmineralizada. Preferentemente, la dosificación del agente de lavado líquido está entre 4,5 y 6,0 gramos por litro de baño de lavado, por ejemplo, 4,7, 4,9 o 5,9 gramos por litro de baño de lavado. Preferentemente se lava en un intervalo de valores de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferentemente entre pH 8 y pH 9.

50 Un agente de lavado en forma de polvo preferente para un sistema de lavado de este tipo está compuesto del siguiente modo (todas las indicaciones en porcentaje en peso): 10 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (sal sódica), 1,5 % de sulfato de alcohol graso C12-C18 (sal sódica), 2,0 % de alcohol graso C12-C18 con 7 OE, 20 % de carbonato sódico, 6,5 % de hidrogenocarbonato sódico, 4,0 % de disilicato sódico amorfo, 17 % de carbonato sódico peroxohidrato, 4,0 % de TAED, 3,0 % de poliácido, 1,0 % de carboximetilcelulosa, 1,0 % de fosfonato, 25 % de sulfato sódico, resto: opcionalmente inhibidores de espuma, agentes de aclaramiento óptico, fragancias y, dado el caso, agua hasta el 100 %. Preferentemente, la dosificación del agente de lavado en forma de polvo está entre 5,5 y 7,0 gramos por litro de baño de lavado, por ejemplo, 5,6, 5,9 o 6,7 gramos por litro de baño de lavado. Preferentemente se lava en un intervalo de valores de pH entre pH 9 y pH 11.

60 De acuerdo con la invención, se usa preferentemente el agente de lavado líquido que se ha mencionado anteriormente para la determinación del rendimiento de limpieza como se indica.

65 El grado de blanco, es decir, el aclaramiento de los ensuciamientos como una medida del rendimiento de limpieza, se determina preferentemente con procedimientos de medición ópticos, preferentemente de forma fotométrica. Un aparato adecuado para esto es, por ejemplo, el espectrómetro Minolta CM508d. Habitualmente se calibran los

aparatos empleados para la medición previamente con un patrón de blanco, preferentemente con un patrón de blanco suministrado.

Gracias al empleo con la misma actividad de la respectiva proteasa se asegura que incluso con una posible divergencia de la proporción de sustancia activa a proteína total (los valores de la actividad específica), se comparen las respectivas propiedades enzimáticas, es decir, por ejemplo, el rendimiento de limpieza en determinados ensuciamientos. En general se cumple que se puede compensar una reducida actividad específica mediante adición de una mayor cantidad de proteína. El experto en el campo de la tecnología de las enzimas conoce procedimientos para la determinación de la actividad de proteasa y aplica los mismos de forma rutinaria. Por ejemplo, tales procedimientos se desvelan en Tenside, volumen 7 (1970), pág. 125-132.

Como alternativa se puede determinar la actividad de proteasa a través de la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (AAPF). La proteasa escinde el sustrato y libera pNA. La liberación de la pNA causa un aumento de la extinción a 410 nm, cuya evolución en el tiempo es una medida de la actividad enzimática (compárese con Del Mar *et al.*, 1979). La medición se realiza a una temperatura de 25 °C, a pH 8,6 y una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición asciende a 5 min y el intervalo de medición es de 20 s a 60 s.

La actividad proteasa se indica habitualmente en unidades de proteasa (UP). Las actividades proteasa adecuadas ascienden, por ejemplo, a 2,25, 5 o 10 UP por ml de baño de lavado. Sin embargo, la actividad proteasa no es igual a cero.

A los agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención pertenecen todos los tipos concebibles de agentes de lavado o limpieza, tanto concentrados como agentes a aplicar de forma no diluida, para el empleo a escala comercial, en la lavadora o en el lavado o la limpieza a mano. A esto pertenecen, por ejemplo, agentes de lavado para materiales textiles, alfombras o fibras naturales para los que se usa la denominación agente de lavado. A esto pertenecen, por ejemplo, también detergentes para la vajilla para lavavajillas o detergentes para el lavado manual de la vajilla o limpiadores para superficies duras tales como metal, vidrio, porcelana, cerámica, baldosas, piedra, superficies lacadas, plásticos, madera o cuero, para los que se usa la denominación agente de limpieza.

Preferentemente, un agente de acuerdo con la invención contiene la proteasa en una cantidad de 2 µg a 20 mg, preferentemente de 5 µg a 17,5 mg, de forma particularmente preferente de 20 µg a 15 mg y de forma muy particularmente preferente de 50 µg a 10 mg por g del agente.

Un agente de acuerdo con la invención puede ser tanto un agente para el gran consumidor o usuario técnico como un producto para el consumidor privado, representando todos los tipos establecidos en el estado de la técnica de agentes de lavado y limpieza asimismo formas de realización de la presente invención.

Los agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención, que pueden estar presentes como sólidos particularmente en forma de polvo, en forma de partículas compactadas posteriormente, como soluciones o suspensiones homogéneas, además de las proteasas empleadas de acuerdo con la invención, en principio, pueden contener todos los ingredientes conocidos y habituales en tales agentes, estando presente preferentemente al menos otro ingrediente en el agente. Los agentes de acuerdo con la invención pueden contener, en particular, sustancias soporte, tensioactivos con actividad superficial, blanqueadores a base de compuestos de peróxígeno orgánicos y/o inorgánicos, activadores de blanqueo, disolventes orgánicos miscibles con agua, enzimas, secuestrantes, electrolitos, reguladores del pH y otros coadyuvantes tales como agentes de aclaramiento óptico, inhibidores de agrisado, reguladores de espuma así como colorantes y fragancias así como combinaciones de los mismos.

En particular resulta ventajosa una combinación de una proteasa contenida en un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención con uno o varios ingredientes adicionales de los agentes, ya que un agente de este tipo presenta un rendimiento mejorado de limpieza debido a sinergias resultantes, en particular entre la proteasa y el otro ingrediente. Esto significa que el agente causa una eliminación mejorada de ensuciamientos, por ejemplo, ensuciamientos que contienen proteína, en comparación con un agente que incluye solo uno de ambos componentes o incluso en comparación con el rendimiento esperado de limpieza de un agente con ambos componentes a causa de la mera adición de las respectivas aportaciones individuales al rendimiento de limpieza del agente de estos dos componentes. En particular, gracias a la combinación de una proteasa contenida en un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención con uno de los tensioactivos y/o sustancias soporte y/o blanqueadores descritos a continuación se consigue una sinergia de este tipo.

Los agentes de acuerdo con la invención pueden contener un tensioactivo o varios tensioactivos, considerándose en particular tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos y sus mezclas, pero también tensioactivos catiónicos, zwitteriónicos y anfóteros.

Los tensioactivos no iónicos adecuados son, en particular, alquilglucósidos y productos de etoxilación y/o propoxilación de alquilglucósidos o alcoholes lineales o ramificados con, respectivamente, de 12 a 18 átomos de C

en la parte de alquilo y de 3 a 20, preferentemente de 4 a 10 grupos alquiléter. Además se pueden usar los correspondientes productos de etoxilación y/o propoxilación de *N*-alquil-aminas, dioles vecinales, ésteres de ácidos grasos y amidas de ácidos grasos que en relación con la parte de alquilo se corresponden con los derivados mencionados de alcohol de cadena larga así como de alquilfenoles con 5 a 12 átomos de C en el resto alquilo.

Como tensioactivos no iónicos se emplean preferentemente alcoholes alcoxilados, ventajosamente etoxilados, en particular primarios con, preferentemente, 8 a 18 átomos de C y como promedio 1 a 12 moles de óxido de etileno (OE) por mol de alcohol, en los que el resto alcohol puede ser lineal o preferentemente tener ramificación de metilo en posición 2 o puede contener mezclados restos lineales y con ramificación de metilo, tal como están presentes habitualmente en restos oxoalcohol. Sin embargo, en particular se prefieren etoxilatos de alcohol con restos lineales de alcoholes de origen nativo con 12 a 18 átomos de C, por ejemplo, de alcohol de grasa de coco, palma, sebo u oleílico y como promedio 2 a 8 OE por mol de alcohol. A los alcoholes etoxilados preferentes pertenecen, por ejemplo, alcoholes C₁₂-C₁₄ con 3 OE o 4 OE, alcoholes C₉-C₁₁ con 7 OE, alcoholes C₁₃-C₁₅ con 3 OE, 5 OE, 7 OE u 8 OE, alcoholes C₁₂-C₁₈ con 3 OE, 5 OE o 7 OE y mezclas de los mismos, así como mezclas de alcohol C₁₂-C₁₄ con 3 OE y alcohol C₁₂-C₁₈ con 7 OE. Los grados indicados de etoxilación representan valores estadísticos, que para un producto especial pueden ser un número entero o fraccionado. Los etoxilatos de alcohol preferidos presentan una distribución de homólogos estrechada (etoxilatos de intervalo estrecho, NRE). Adicionalmente a estos tensioactivos no iónicos se pueden emplear también alcoholes grasos con más de 12 OE. Son ejemplos de esto los alcoholes grasos (de sebo) con 14 OE, 16 OE, 20 OE, 25 OE, 30 OE o 40 OE. En particular en agentes para el empleo en procedimientos a máquina se emplean habitualmente compuestos extremadamente pobres en espuma. A esto pertenecen, preferentemente, alquil-C₁₂-C₁₈-polietilenglicol-polipropilenglicoléter con, respectivamente hasta 8 moles de unidades de óxido de etileno y óxido de propileno en la molécula. No obstante, se pueden usar también otros tensioactivos no iónicos de forma conocida pobres en espuma, tales como, por ejemplo, alquil-C₁₂-C₁₈-polietilenglicol-polibutilenglicoléter con, respectivamente, hasta 8 moles de unidades de óxido de etileno y óxido de butileno en la molécula así como éteres mixtos de alquilpolialquilenglicol cerrados con grupo terminal. También son particularmente preferentes los alcoholes alcoxilados que contienen grupos hidroxilo, tal como están descritos en la solicitud de patente europea EP 0 300 305, los denominados hidroxiéteres mixtos. A los tensioactivos no iónicos pertenecen también alquilglucósidos con la fórmula general RO(G)_x, en la que R significa un resto alifático primario de cadena lineal o con ramificación de metilo, en particular con ramificación de metilo en posición 2, con 8 a 22, preferentemente 12 a 18 átomos de C y G se refiere a una unidad de glucosa con 5 o 6 átomos de C, preferentemente glucosa. El grado de oligomerización x, que indica la distribución de monoglucósidos y oligoglucósidos, es un número discrecional —que como variable a determinar analíticamente puede adoptar también valores fraccionados— entre 1 y 10; preferentemente x se encuentra en 1,2 a 1,4. Asimismo son adecuadas amidas de polihidroxiácido graso de la Fórmula (III), en la que R¹CO se refiere a un resto acilo alifático con 6 a 22 átomos de carbono, R² a hidrógeno, un resto alquilo o hidroxialquilo con 1 a 4 átomos de carbono y [Z] un resto polihidroxialquilo lineal o ramificado con 3 a 10 átomos de carbono y 3 a 10 grupos hidroxilo:



Preferentemente se derivan las amidas de polihidroxiácido graso de azúcares reductores con 5 o 6 átomos de carbono, en particular de la glucosa. Al grupo de las amidas de polihidroxiácido graso pertenecen también compuestos de Fórmula (IV)



en la que R³ se refiere a un resto alquilo o alquilenol lineal o ramificado con 7 a 12 átomos de carbono, R⁴ a un resto alquilenol lineal, ramificado o cíclico o un resto arileno con 2 a 8 átomos de carbono y R⁵ a un resto alquilo lineal, ramificado o cíclico o un resto arilo o un resto oxi-alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, prefiriéndose restos alquilo C₁-C₄ o fenilo, y [Z] a un resto polihidroxialquilo lineal, cuya cadena de alquilo está sustituida con al menos dos grupos hidroxilo, o derivados alcoxilados, preferentemente etoxilados o propoxilados de este resto. [Z] aquí se obtiene también preferentemente mediante aminación reductora de un azúcar, tal como glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, galactosa, manosa o xilosa. Los compuestos sustituidos con *N*-alcoxi o *N*-ariloxi entonces se pueden convertir, por ejemplo, mediante reacción con ésteres de metilo de ácido graso en presencia de un alcóxido como catalizador en las amidas de polihidroxiácido graso deseadas. Otra clase de tensioactivos no iónicos empleados preferentemente, que se emplean como único tensioactivo no iónico o en combinación con otros tensioactivos no iónicos, en particular junto con alcoholes grasos alcoxilados y/o alquilglucósidos, son los ésteres de alquilo de ácido graso alcoxilados, preferentemente etoxilados o etoxilados y propoxilados, preferentemente con 1 a 4 átomos de carbono en la cadena de alquilo, en particular ésteres de metilo de ácido graso. También pueden ser adecuados tensioactivos no iónicos del tipo de los aminóxidos, por ejemplo, óxido de *N*-alquilo de coco-*N,N*-dimetilamina y *N*-alquilo de sebo-*N,N*-dihidroxietilamina y de las alcanolamidas de ácido graso. La cantidad de estos tensioactivos no

iónicos preferentemente no asciende a más de la de los alcoholes grasos etoxilados, en particular no más de la mitad de los mismos. Como otros tensioactivos se consideran los denominados tensioactivos Gemini. Por esto generalmente se entiende aquellos compuestos que poseen dos grupos hidrófilos por molécula. Estos grupos están separados entre sí por norma general por un denominado "espaciador". Por norma general, este espaciador es una cadena de carbono que debería ser lo suficientemente larga para que los grupos hidrófilos tuviesen una separación suficiente para que pudieran actuar de forma completamente independiente entre sí. Tales tensioactivos generalmente se caracterizan por una concentración de micelas crítica inusualmente reducida y la capacidad de reducir intensamente la tensión superficial del agua. En casos excepcionales, por la expresión tensioactivos Gemini se entiende no solamente tales tensioactivos "diméricos", sino también correspondientemente "triméricos". Son tensioactivos Gemini adecuados, por ejemplo, hidroxietéres mixtos sulfatados o bis-sulfatos de alcoholes diméricos y tris-sulfatos y étersulfatos de alcoholes triméricos. Los éteres mixtos diméricos y triméricos cerrados con grupo terminal se caracterizan, en particular, por su bi- y multifuncionalidad. De este modo, los tensioactivos cerrados con grupo terminal mencionados poseen buenas propiedades humectantes y, a este respecto, son pobres en espuma, de tal manera que son particularmente adecuados para el empleo en procedimientos de lavado o limpieza a máquina. No obstante, también se pueden emplear amidas de polihidroxiácidos grasos Gemini o amidas de polipolihidroxiácidos grasos. También son adecuados los monoésteres de ácido sulfúrico de los alcoholes C₇-C₂₁ de cadena lineal o ramificados etoxilados con 1 a 6 moles de óxido de etileno, tales como alcoholes C₉-C₁₁ con ramificación de 2-metilo con, como promedio, 3,5 moles de óxido de etileno (OE) o alcoholes grasos C₁₂-C₁₈ con 1 a 4 OE. A los tensioactivos aniónicos preferentes pertenecen también las sales del ácido alquilsulfosuccínico, que se denominan también sulfosuccinatos o ésteres de ácido sulfosuccínico, y que representan monoésteres y/o diésteres del ácido sulfosuccínico con alcoholes, preferentemente alcoholes grasos y, en particular, alcoholes grasos etoxilados. Los sulfosuccinatos preferentes contienen restos alcohol graso C₈ a C₁₈ o mezclas de los mismos. Los sulfosuccinatos particularmente preferentes contienen un resto alcohol graso que se deriva de alcoholes grasos etoxilados que, considerados de por sí, representan tensioactivos no iónicos. A este respecto, a su vez se prefieren en particular sulfosuccinatos cuyos restos alcohol graso se derivan de alcoholes grasos etoxilados con distribución de homólogos estrechada. Asimismo también es posible emplear ácido alqu(en)ilsuccínico con, preferentemente 8 a 18 átomos de carbono en la cadena de alqu(en)ilo o sus sales. Como otros tensioactivos aniónicos se consideran derivados de ácidos grasos de aminoácidos, por ejemplo de *N*-metiltaurina (tauridas) y/o de *N*-metilglicina (sarcosidas). A este respecto son particularmente preferentes las sarcosidas o los sarcosinatos y, entre estos, sobre todo sarcosinatos de ácidos grasos superiores y, dado en el caso, mono- o poliinsaturados, tales como oleilsarcosinato. Como otros tensioactivos aniónicos se consideran en particular jabones. En particular son adecuados jabones de ácidos grasos saturados, tales como sales de ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido erúico hidrogenado y ácido behénico, así como en particular mezclas de jabones derivados de ácidos grasos naturales, por ejemplo, ácidos grasos de coco, palmiste o sebo. Junto con estos jabones o como sustituyentes de jabones se pueden emplear también las sales de ácido alquenilsuccínico conocidas.

Los tensioactivos aniónicos, incluyendo los jabones, pueden estar presentes en forma de sus sales de sodio, potasio o amonio y como sales solubles de bases orgánicas tales como mono-, di- o trietanolamina. Preferentemente, los tensioactivos aniónicos están presentes en forma de sus sales de sodio o potasio, en particular en forma de las sales de sodio.

Los tensioactivos están contenidos en agentes de acuerdo con la invención en partes de cantidades de preferentemente el 5 % en peso al 50 % en peso, en particular del 8 % en peso al 30 % en peso.

Un agente de acuerdo con la invención contiene, preferentemente, al menos una sustancia soporte soluble en agua y/o insoluble en agua, orgánica y/o inorgánica. A las sustancias soporte orgánicas solubles en agua pertenecen ácidos policarboxílicos, en particular ácido cítrico y azúcares ácidos, ácidos aminopolicarboxílicos monoméricos y poliméricos, en particular ácido metilglicindiacético, ácido nitrilotriacético y ácido etilendiamintetraacético, así como ácido poliaspártico, ácido polifosfónico, en particular ácido aminotris(metilenfosfónico), ácido etilendiamintetrakis(metilenfosfónico) y ácido 1-hidroxietan-1,1-difosfónico, compuestos hidroxí poliméricos tales como dextrina así como ácidos (poli-)carboxílicos poliméricos, en particular los policarboxilatos obtenibles mediante oxidación de polisacáridos o dextrinas, ácidos acrílicos poliméricos, ácidos metacrílicos, ácidos maleicos y polímeros mixtos de los mismos que pueden contener también pequeñas partes de sustancias polimerizables sin funcionalidad de ácido carboxílico introducidas mediante polimerización. La masa molecular relativa de los homopolímeros de ácidos carboxílicos insaturados se encuentra, generalmente, entre 3 000 y 200 000, la de los copolímeros entre 2 000 y 200 000, preferentemente de 30 000 a 120 000, respectivamente en relación con el ácido libre. Un copolímero particularmente preferido de ácido acrílico-ácido maleico presenta una masa molecular relativa de 30 000 a 100 000. Son productos disponibles en el mercado, por ejemplo, Sokalan® CP 5, CP 10 y PA 30 de la empresa BASF. Son compuestos adecuados, aunque menos preferentes, de esta clase los copolímeros del ácido acrílico o ácido metacrílico con éteres de vinilo, tales como vinilmetiléteres, viniléster, etileno, propileno y estireno, en los que la parte del ácido asciende al menos al 50 % en peso. Como sustancias soporte orgánicas solubles en agua se pueden emplear también terpolímeros que, como monómeros, contienen dos ácidos insaturados y/o sus sales y como tercer monómero, alcohol vinílico y/o un alcohol vinílico esterificado o un hidrato de carbono. El primer monómero ácido o su sal se deriva de un ácido carboxílico C₃-C₈ monoetilénicamente insaturado y preferentemente de un ácido monocarboxílico C₃-C₄, en particular de ácido (met)acrílico. El segundo monómero ácido o su sal puede ser un derivado de un ácido dicarboxílico C₄-C₈, prefiriéndose en particular ácido maleico, y/o un derivado de un ácido

alquilsulfónico que está sustituido en posición 2 con un resto alquilo o arilo. Generalmente, tales polímeros presentan una masa molecular relativa entre 1 000 y 200 000. Otros copolímeros preferidos son aquellos que como monómeros presentan preferentemente acroleína y ácido acrílico/sales de ácido acrílico o acetato de vinilo. Las sustancias soporte orgánicas pueden emplearse, en particular para la preparación de agentes líquidos, en forma de soluciones acuosas, preferentemente en forma de soluciones acuosas del 30 al 50 por cien en peso. Todos los ácidos mencionados se emplean por norma general en forma de sus sales solubles en agua, en particular sus sales de metal alcalino.

Tales sustancias soporte orgánicas pueden estar contenidas, en caso deseado, en cantidades de hasta el 40 % en peso, en particular de hasta el 25 % en peso y preferentemente del 1 % en peso al 8 % en peso. Las cantidades próximas al límite superior mencionado se emplean preferentemente en agentes de acuerdo con la invención pastosos o líquidos, en particular que contienen agua.

Como materiales de soporte inorgánicos solubles en agua se consideran en particular silicatos de metal alcalino, carbonatos de metal alcalino y fosfatos de metal alcalino que pueden estar presentes en forma de sus sales de sodio o potasio alcalinas, neutras o ácidas. Son ejemplos de esto fosfato trisódico, difosfato tetrasódico, hidrogenodifosfato disódico, trifosfato pentasódico, el denominado hexametáfosfato sódico, fosfato trisódico oligomérico con grados de oligomerización de 5 a 1000, en particular de 5 a 50, así como las correspondientes sales de potasio o mezclas de sales de sodio y potasio. Como materiales de soporte inorgánicos insolubles en agua, dispersables en agua se emplean en particular aluminosilicatos de metal alcalino cristalinos o amorfos en cantidades de hasta el 50 % en peso, preferentemente no más del 40 % en peso y en agentes líquidos en particular del 1 % en peso al 5 % en peso. Entre estos se prefieren los aluminosilicatos de sodio cristalinos con calidad de agente de lavado, en particular zeolita A, P y dado el caso X, en solitario o mezclas, por ejemplo en forma de un co-cristalizado de las zeolitas A y X (Vegobond® AX, un producto comercial de Condea Augusta S.p.A.). Las cantidades próximas al límite superior mencionado se emplean preferentemente en agentes sólidos con forma de partículas. Los aluminosilicatos adecuados en particular no presentan partículas con un tamaño de grano por encima de 30 µm y preferentemente están compuestos en al menos el 80 % en peso de partículas con un tamaño menor de 10 µm. Su capacidad de unión a calcio, que se puede determinar según las indicaciones del documento de patente alemana DE 24 12 837, se encuentra por norma general en el intervalo de 100 a 200 mg de CaO por gramo.

Los sustitutos adecuados o sustitutos parciales del aluminosilicato mencionado son silicatos de metal alcalino cristalinos que pueden estar presentes en solitario o en mezcla con silicatos amorfos. Los silicatos de metal alcalino que se pueden utilizar en los agentes de acuerdo con la invención como ayudantes presentan, preferentemente, una proporción molar de óxido de metal alcalino a SiO₂ por debajo de 0,95, en particular de 1:1,1 a 1:12, y pueden estar presentes en forma amorfa o cristalina. Son silicatos de metal alcalino preferidos los silicatos de sodio, en particular los silicatos de sodio amorfos, con una proporción molar Na₂O:SiO₂ de 1:2 a 1:2,8. Como silicatos cristalinos que pueden estar presentes en solitario o en mezcla con silicatos amorfos se emplean preferentemente filosilicatos cristalinos con la fórmula general Na₂Si_xO_{2x+1} · y H₂O, en la que x, el denominado módulo, es un número de 1,9 a 22, en particular de 1,9 a 4 e y un número de 0 a 33 y siendo valores preferentes para x 2, 3 o 4. Los filosilicatos cristalinos preferentes son aquellos en los que x adopta los valores 2 o 3 en la fórmula general mencionada. En particular se prefieren tanto β- como δ-disilicatos de sodio (Na₂Si₂O₅ · y H₂O). También se pueden emplear en agentes de acuerdo con la invención silicatos de metal alcalino cristalinos prácticamente sin agua preparados a partir de silicatos de metal alcalino amorfos de la fórmula general que se ha mencionado anteriormente, en la que x significa un número de 1,9 a 2,1. En otra forma de realización preferente de agentes de acuerdo con la invención se emplea un filosilicato de sodio cristalino con un módulo de 2 a 3, tal como se puede producir a partir de arena y carbonato de sodio. Se emplean silicatos de sodio cristalinos con un módulo en el intervalo de 1,9 a 3,5 en otra forma de realización preferente de agentes de acuerdo con la invención. Los silicatos de tipo hoja cristalinos de la Fórmula (I) indicada anteriormente se comercializan por la empresa Clariant GmbH con el nombre comercial Na-SKS, por ejemplo Na-SKS-1, (Na₂Si₂₂O₄₅xH₂O, kenyaíta), Na-SKS-2 (Na₂Si₁₄O₂₉xH₂O, magadiíta), Na-SKS-3 (Na₂Si₈O₁₇xH₂O) o Na-SKS-4 (Na₂Si₄O₉xH₂O, makatita). De los mismos son adecuados sobre todo Na-SKS-5 (α-Na₂Si₂O₅), Na-SKS-7 (β-Na₂Si₂O₅, natrosilita), Na-SKS-9 (NaHSi₂O₅·3H₂O), Na-SKS-10 (NaHSi₂O₅·3H₂O, kanemita), Na-SKS-11 (t-Na₂Si₂O₅) y Na-SKS-13 (NaHSi₂O₅), pero en particular Na-SKS-6 (δ-Na₂Si₂O₅). En una configuración preferente de agentes de acuerdo con la invención se emplea un compuesto granular de filosilicato cristalino y citrato, de filosilicato cristalino y ácido policarboxílico (co)polimérico que se ha mencionado anteriormente o de silicato de metal alcalino y carbonato de metal alcalino como está disponible en el mercado, por ejemplo, con el nombre Nabion® 15.

Las sustancias soporte están contenidas en los agentes de acuerdo con la invención preferentemente en cantidades de hasta el 75 % en peso, en particular del 5 % en peso al 50 % en peso.

Como compuestos de peroxígeno adecuados para el empleo en agentes de acuerdo con la invención se consideran, en particular, perácidos orgánicos o sales perácidas de ácidos orgánicos, tales como ácido ftalimidopercaproico, ácido perbenzoico o sales del diácido diperdodecanoico, peróxido de hidrógeno y sales inorgánicas que ceden peróxido de hidrógeno en las condiciones de lavado a las que pertenecen perborato, percarbonato, persilicato y/o persulfato tal como caroato. Siempre que se deban emplear compuestos de peroxígeno sólidos, los mismos se

pueden usar en forma de polvos o granulados que también pueden estar envueltos de forma en principio conocida. En caso de que un agente de acuerdo con la invención contenga compuestos de peróxígeno, los mismos están presentes en cantidades de, preferentemente, hasta el 50 % en peso, en particular del 5 % en peso al 30 % en peso. La adición de reducidas cantidades de estabilizantes conocidos de blanqueador tal como, por ejemplo, de fosfonatos, boratos o metaboratos y metasilicatos así como sales de magnesio tales como sulfato de magnesio puede ser apropiada.

Como activadores de blanqueo se pueden emplear compuestos que en condiciones de perhidrólisis da lugar a ácidos peroxocarbónicos alifáticos con, preferentemente, 1 a 10 átomos de C, en particular 2 a 4 átomos de C y/o, dado el caso, ácido perbenzoico sustituido. Son adecuadas sustancias que llevan grupos *O*- y/o *N*-acilo del número de átomos de C mencionado y/o grupos benzoilo dado el caso sustituidos. Se prefieren alquilendiaminas poliáciladas, en particular tetraacetiletilendiamina (TAED), derivados de triazina acilados, en particular 1,5-diacetil-2,4-dioxohexahidro-1,3,5-triazina (DADHT), glicolurilos acilados, en particular tetraacetilglicolurilo (TAGU), *N*-acilimidazidas, en particular *N*-nonanoilsuccinimida (NOSI), fenolsulfonatos acilados, en particular *n*-nonanoil- o isononanoiloxibencenosulfonato (*n*- o *iso*-NOBS), anhídridos de ácido carboxílico, en particular anhídrido de ácido ftálico, alcoholes polihidroxílicos acilados, en particular triacetina, diacetato de etilenglicol, 2,5-diacetoxi-2,5-dihidrofurano y enoléster así como sorbitol acetilado y manitol o sus mezclas descritas (SORMAN), derivados de azúcar acilados, en particular pentaacetilglucosa (PAG), pentaacetilfructosa, tetraacetilxilosa y octaacetilactosa así como glucamina acetilada dado el caso *N*-alquilada y gluconolactona y/o lactamas *N*-aciladas, por ejemplo *N*-benzoil caprolactama. Los acilacetales sustituidos de forma hidrófila y las acilactamas se emplean también de forma preferente. Se pueden emplear también combinaciones de activadores de blanqueo convencionales. Tales activadores de blanqueo pueden estar contenidos, en particular con presencia de los blanqueadores que proporcionan peróxido de hidrógeno que se han mencionado anteriormente, en el intervalo de cantidades habitual, preferentemente en cantidades del 0,5 % en peso al 10 % en peso, en particular del 1 % en peso al 8 % en peso, en relación con todo el agente, pero preferentemente están ausentes por completo con empleo de ácido percarbónico como único blanqueador.

Adicionalmente a los activadores de blanqueo convencionales o en su lugar pueden estar contenidas también sulfonaminas y/o sales de metal de transición de refuerzo del blanqueo o complejos de metal de transición como denominados catalizadores de blanqueo.

A los disolventes orgánicos que se pueden usar además de agua en los agentes de acuerdo con la invención, en particular cuando están presentes en forma líquida o pastosa, pertenecen alcoholes con 1 a 4 átomos de C, en particular metanol, etanol, isopropanol y *terc*-butanol, dioles con 2 a 4 átomos de C, en particular etilenglicol y propilenglicol, así como sus mezclas y los éteres derivables de las clases de compuestos que se han mencionado. Tales disolventes miscibles con agua están presentes en los agentes de acuerdo con la invención, preferentemente, en cantidades no superiores al 30 % en peso, en particular del 6 al 20 % en peso.

Para el ajuste de un valor de pH deseado que no resulta por sí mismo debido a la mezcla de los restantes componentes, los agentes de acuerdo con la invención pueden contener ácidos compatibles con el sistema y el medio ambiente, en particular ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido glutárico y/o ácido adípico, pero también ácidos minerales, en particular ácido sulfúrico o bases, en particular hidróxidos de amonio o de metal alcalino. Tales reguladores del pH están contenidos en los agentes de acuerdo con la invención en cantidades de, preferentemente, no más del 20 % en peso, en particular del 1,2 % en peso al 17 % en peso.

Los inhibidores de agrisado tienen la tarea de mantener suspendida en el baño la suciedad desprendida de la fibra textil. Para esto son adecuados coloides solubles en agua la mayoría de las veces de naturaleza orgánica, por ejemplo almidón, cola, gelatina, sales de ácidos etercarbónicos o ácidos etersulfónicos de almidón o de celulosa o sales de ésteres de ácido sulfúrico ácidos de celulosa o de almidón. Para este fin son adecuadas también poliamidas solubles en agua que contienen grupos ácidos. Además se pueden usar derivados de almidón diferentes de los mencionados anteriormente, por ejemplo almidones de aldehído. Preferentemente se emplean éteres de celulosa, tales como carboximetilcelulosa (sal de Na), metilcelulosa, hidroxialquilcelulosa y éteres mixtos, tales como metilhidroxietilcelulosa, metilhidroxipropilcelulosa, metilcarboximetilcelulosa y sus mezclas, por ejemplo, en cantidades del 0,1 al 5 % en peso en relación con los agentes.

Los agentes de lavado de materiales textiles de acuerdo con la invención pueden contener como agentes de aclaramiento óptico, por ejemplo, derivados del ácido diaminoestilbendisulfónico o sus sales de metal alcalino, a pesar de que para el empleo como agente de lavado de color preferentemente están exentos de agentes de aclaramiento óptico. Son adecuadas, por ejemplo, sales del ácido 4,4'-bis(2-anilino-4-morfolino-1,3,5-triazinil-6-amino)estilben-2,2'-disulfónico o compuestos estructurados del mismo modo que, en lugar del grupo morfolino, llevan un grupo dietanolamino, un grupo metilamino, un grupo anilino o un grupo 2-metoxietilamino. Además pueden estar presentes agentes de aclaramiento del tipo de los difenilestirilos sustituidos, por ejemplo las sales de metal alcalino de 4,4'-bis(2-sulfoestiril)-difenilo, 4,4'-bis(4-cloro-3-sulfoestiril)-difenilo o 4-(4-cloroestiril)-4'-(2-sulfoestiril)-difenilo. Se pueden usar también mezclas de los agentes de aclaramiento óptico que se han mencionado anteriormente.

En particular con el empleo en procedimientos a máquina puede ser ventajoso añadir a los agentes inhibidores de espuma habituales. Como inhibidores de espuma son adecuados, por ejemplo, jabones de origen natural o sintético que presentan una elevada parte de ácidos grasos C_{18} - C_{24} . Son inhibidores de espuma no de tipo tensioactivo adecuados, por ejemplo, organopolisiloxanos y sus mezclas con ácido silícico microfino, dado el caso silanizado, así como parafinas, ceras, ceras microcristalinas y sus mezclas con ácido silícico silanizado o bisalquilendiamidas de ácido graso. Ventajosamente se usan también mezclas de distintos inhibidores de espuma, por ejemplo las de siliconas, parafinas o ceras. Preferentemente, los inhibidores de espuma, en particular inhibidores de espuma que contienen silicona y/o parafina, están unidos a una sustancia de soporte granular, soluble o dispersable en agua. En particular a este respecto se prefieren mezclas de parafinas y biesteariletilendiamida.

Los ingredientes a seleccionar al igual que las condiciones en las que se emplea el agente, tales como, por ejemplo, temperatura, valor de pH, fuerza iónica, relaciones redox o influencias mecánicas, deberían estar optimizadas para el respectivo problema de limpieza. De este modo, las temperaturas habituales para agentes de lavado y limpieza se encuentran en intervalos de 10 °C por encima de 40 °C y 60 °C hasta 95 °C en agentes a máquina o aplicaciones técnicas. Ya que en las lavadoras y los lavavajillas modernos la temperatura la mayoría de las veces se puede ajustar sin pasos, están incluidos también todos los pasos intermedios de la temperatura. Preferentemente, los ingredientes de los respectivos agentes se ajustan entre sí. Se prefieren sinergias en relación con el rendimiento de limpieza. Son particularmente preferentes sinergias que existen en un intervalo de temperaturas entre 10 °C y 60 °C, en particular en un intervalo de temperaturas de 10 °C a 60 °C, de 10 °C a 50 °C, de 10 °C a 40 °C, de 10 °C a 30 °C, de 15 °C a 30 °C, de 10 °C a 25 °C y de 15 °C a 25 °C.

La preparación de agentes sólidos de acuerdo con la invención no plantea ninguna dificultad y se puede realizar de forma conocida, por ejemplo, mediante secado por pulverización o granulación, añadiéndose enzimas y posibles ingredientes termosensibles adicionales tales como, por ejemplo, blanqueadores, dado el caso posteriormente por separado. Para la preparación de agentes de acuerdo con la invención con un mayor peso aparente, en particular en el intervalo de 650 g/l a 950 g/l, se prefiere un procedimiento que presente una etapa de extrusión.

Para la preparación de agentes de acuerdo con la invención en forma de pastilla que pueden ser monofásicos o multifásicos, de un color o varios colores y pueden estar compuestos en particular de una capa o de varias, en particular, de dos capas, preferentemente se procede de tal manera que se mezclan entre sí todos los constituyentes —dado el caso respectivamente de una capa— en una mezcladora y la mezcla se prensa mediante prensas convencionales para pastillas, por ejemplo, prensas excéntricas o prensas rotativas con fuerzas de prensado en el intervalo de aproximadamente 50 a 100 kN, preferentemente de 60 a 70 kN. En particular, con pastillas multicapa puede ser ventajoso que se preñe previamente al menos una capa. Esto se lleva a cabo preferentemente con fuerzas de prensado entre 5 y 20 kN, en particular de 10 a 15 kN. De este modo se obtienen sin problemas pastillas resistentes a la rotura y, a pesar de esto, solubles con la suficiente rapidez en las condiciones de aplicación, con resistencias a la rotura y la flexión normalmente de 100 a 200 N, sin embargo preferentemente por encima de 150 N. Preferentemente, una pastilla preparada de este modo presenta un peso de 10 g a 50 g, en particular de 15 g a 40 g. La forma espacial de las pastillas es discrecional y puede ser redonda, oval o angulada, siendo posibles también formas intermedias. Ventajosamente, las esquinas y los cantos están redondeados. Las pastillas redondas preferentemente presentan un diámetro de 30 mm a 40 mm. En particular, el tamaño de pastillas diseñadas con forma angulada o de ortoedro que se introducen sobre todo a través del dispositivo de dosificación, por ejemplo, del lavavajillas, depende de la geometría y del volumen de este dispositivo de dosificación. Las formas de realización preferentes a modo de ejemplo presentan una superficie de base de (20 a 30 mm) x (34 a 40 mm), en particular de 26 x 36 mm o de 24 x 38 mm.

Los agentes de acuerdo con la invención líquidos o pastosos en forma de soluciones que contienen disolventes habituales se preparan, por norma general, mediante simple mezcla de los ingredientes que se pueden añadir en sustancia o como solución a una mezcladora automática.

Por tanto, las formas de realización de la presente invención comprenden todas las formas de presentación sólidas, en forma de polvo, líquidas, en forma de gel o pastosas de los agentes que, dado el caso, pueden estar compuestas también de varias fases y pueden estar presentes en forma tanto comprimida como no comprimida. Por tanto, los agentes que están caracterizados por que están presentes como sistema de un componente representan otra forma de realización de la invención. Tales agentes preferentemente están compuestos de una fase. Por el contrario, los agentes que están compuestos de varias fases están caracterizados por que están divididos en varios componentes. A las formas de presentación sólidas de acuerdo con la invención además pertenecen extrudidos, granulados, pastillas o bolsillos que pueden estar presentes en envases grandes o también envasados por porciones.

Un agente de acuerdo con la invención puede estar presente como polvo suelto, en particular con un peso aparente de 300 g/l a 1200 g/l, en particular de 500 g/l a 900 g/l o de 600 g/l a 850 g/l.

Como alternativa, los agentes de acuerdo con la invención pueden ser también líquidos, estar en forma de gel o ser pastosos. Otra forma de realización de la invención, por tanto, está caracterizada por que el agente de lavado o limpieza está presente en forma líquida, en forma de gel o pastosa, en particular en forma de un agente de lavado

líquido no acuoso o una pasta no acuosa o en forma de un agente de lavado líquido acuoso o una pasta que contiene agua.

El agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención puede estar envasado en un depósito, preferentemente un depósito permeable a aire, del que se libera justo antes del uso o durante el proceso de lavado. En particular, la proteasa contenida en el agente y/u otros ingredientes del agente pueden estar envueltos con una sustancia impermeable para la enzima a temperatura ambiente o en ausencia de agua que, en condiciones de aplicación del agente, se hace permeable para la enzima. Una forma de realización de este tipo de la invención, por lo tanto, está caracterizada por que la proteasa está envuelta con una sustancia impermeable para la proteasa a temperatura ambiente y/o en ausencia de agua.

Los agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención pueden contener exclusivamente una proteasa tal como se ha descrito. Como alternativa pueden contener también otras enzimas hidrolíticas u otras enzimas en una concentración apropiada para la eficacia del agente. Por tanto, otro objeto de la invención lo representan agentes que, además, comprenden una o varias enzimas adicionales, pudiéndose emplear en principio todas las enzimas establecidas para estos fines en el estado de la técnica. Como otras enzimas se pueden emplear preferentemente todas las enzimas que pueden desplegar en el agente de acuerdo con la invención una actividad catalítica, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanas, xantanasa, β -glucosidasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa, así como, preferentemente, sus mezclas. En principio, estas enzimas son de origen natural; partiendo de las moléculas naturales están disponibles para el empleo en agentes de lavado y limpieza variantes mejoradas que se emplean correspondientemente de forma preferida.

Los agentes de acuerdo con la invención contienen enzimas preferentemente en cantidades totales del 1×10^{-8} al 5 por ciento en peso en relación con la proteína activa. Preferentemente, las enzimas están contenidas del 0,001 al 5 % en peso, más preferentemente del 0,01 al 5 % en peso, aún más preferentemente del 0,05 al 4 % en peso y de forma particularmente preferente del 0,075 al 3,5 % en peso en los agentes de acuerdo con la invención, pudiendo estar presente cada enzima contenida en las proporciones de cantidades mencionadas. Las enzimas pueden estar adsorbidas a sustancias de soporte y/o estar incluidas en sustancias envolventes para proteger las mismas frente a una inactivación prematura.

La concentración de la proteína se puede determinar con ayuda de métodos conocidos, por ejemplo el procedimiento de BCA (ácido bicínico; ácido 2,2'-bicinólil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M. M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), pág. 751-766).

En caso de la comparación de los rendimientos de dos enzimas de agente de lavado se tiene que diferenciar entre el empleo con la misma proteína y la misma actividad. En particular en caso de preparaciones obtenidas mediante ingeniería genética, esencialmente sin actividad secundaria, es razonable el empleo con la misma proteína. De hecho, de este modo es posible una afirmación acerca de si las mismas cantidades de proteína —como medida de la ganancia de la producción fermentativa— conducen a resultados comparables. Si difieren las respectivas proporciones de sustancia activa a proteína total (los valores de la actividad específica), entonces se ha recomendar una comparación con la misma actividad, debido que a través de esto se comparan las respectivas propiedades enzimáticas. En general se aplica que una reducida actividad específica se puede compensar mediante adición de una mayor cantidad de proteína.

De forma particularmente preferente, las enzimas muestran efectos sinérgicos en relación con su efecto frente a determinados ensuciamientos o manchas, es decir, las enzimas contenidas en la composición de agente se respaldan mutuamente en su rendimiento de limpieza. De forma muy particularmente preferente existe una sinergia de este tipo entre la proteasa contenida de acuerdo con la invención y otra enzima de un agente de acuerdo con la invención, entre esto en particular entre la proteasa mencionada y una amilasa y/o una mananasa y/o una lipasa. Pueden aparecer efectos sinérgicos no solo entre distintas enzimas, sino también entre una o varias enzimas y otros ingredientes del agente de acuerdo con la invención.

Entre las proteasas se prefieren aquellas del tipo subtilisina. Son ejemplo de esto las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*, la subtilisina DY y las enzimas a asignar a las subtilasas, sin embargo, ya no a las subtilisinas en el sentido más estricto termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7. La subtilisina Carlsberg está disponible en una forma perfeccionada con el nombre comercial Alcalase® en la empresa Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca. Las subtilisinas 147 y 309 se comercializan con el nombre comercial Esperase® o Savinase® por la empresa Novozymes. De la proteasa de *Bacillus lentus* DSM 5483 se derivan las variantes de proteasa comercializadas con la denominación BLAP®. Otras proteasas útiles son, por ejemplo, las enzimas disponibles con el nombre comercial Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym®, Natalase®, Kannase® y Ovozyme® de la empresa Novozymes, con el nombre comercial Purafect®, Purafect® OXP, Purafect® Prime, Excellase® y Properase® de la empresa Genencor, con el nombre comercial Protosol® de la empresa Advanced Biochemicals Ltd., Thane, India, con el nombre comercial Wuxi® de la empresa Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, con el nombre comercial Proleather® y Protease P® de la empresa Amano

Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japón y con la denominación proteínasa K-16 de la empresa Kao Corp., Tokio, Japón. Se emplean de forma particularmente preferente también las proteasas de *Bacillus gibsonii* y *Bacillus pumilus* que están desveladas en las solicitudes de patente internacionales WO2008/086916 y WO2007/131656.

Son ejemplos de amilasas confeccionables de acuerdo con la invención las α -amilasas de *Bacillus licheniformis*, de *B. amyloliquefaciens* o de *B. stearothermophilus* así como sus perfeccionamientos mejorados para el empleo en agentes de lavado o limpieza. La enzima de *B. licheniformis* está disponible en la empresa Novozymes con el nombre Termamyl® y en la empresa Genencor con el nombre Purastar®ST. Están disponibles productos perfeccionados de esta α -amilasa en la empresa Novozymes con el nombre comercial Duramyl® y Termamyl®ultra, en la empresa Genencor con el nombre Purastar®OxAm y en la empresa Daiwa Seiko Inc., Tokio, Japón como Keistase®. La α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* se comercializa por la empresa Novozymes con el nombre BAN®, y variantes derivadas de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* con el nombre BSG® y Novamyl®, también de la empresa Novozymes.

Además, para este fin se han de destacar la α -amilasa de *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) y la ciclodextrin-glucanotransferasa (CGTasa) de *B. agaradherens* (DSM 9948). Además se pueden emplear las enzimas amilolíticas que pertenecen al espacio de secuencia de las α -amilasas que se define en la solicitud de patente internacional WO 03/002711 A2 y las que se describen en la solicitud WO 03/054177 A2. Asimismo se pueden emplear productos de fusión de las moléculas mencionadas.

Además son adecuados los perfeccionamientos disponibles con el nombre comercial Fungamyl® de la empresa Novozymes de la α -amilasa de *Aspergillus niger* y *A. oryzae*. Otros productos comerciales que se pueden emplear son, por ejemplo, Amylase-LT® y Stainzyme® o Stainzyme ultra® o Stainzyme plus®, esta última también de la empresa Novozymes. De acuerdo con la invención se pueden emplear también variantes de estas enzimas obtenibles mediante mutación puntual.

Son ejemplos de lipasas o cutinasas confeccionables de acuerdo con la invención que están contenidas en particular debido a sus actividades de escisión de triglicéridos, pero también para generar perácidos *in situ* a partir de precursores adecuados, las lipasas obtenidas originalmente de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*) o perfeccionadas, en particular aquellas con la sustitución de aminoácidos D96L. Se comercializan, por ejemplo, por la empresa Novozymes con el nombre comercial Lipolase®, Lipolase®Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® y Lipex®. Además se pueden emplear, por ejemplo, las cutinasas que se han aislado originalmente de *Fusarium solani pisi* y *Humicola insolens*. Se pueden obtener también lipasas útiles en la empresa Amano con las denominaciones Lipase CE®, Lipase P®, Lipase B® o Lipase CES®, Lipase AKG®, *Bacillis sp.* Lipase®, Lipase AP®, Lipase M-AP® y Lipase AML®. De la empresa Genencor se pueden emplear, por ejemplo, las lipasas o cutinasas cuyas enzimas de partida se han aislado originalmente de *Pseudomonas mendocina* y *Fusarium solanii*. Como otros productos comerciales importantes se han de mencionar las preparaciones comercializadas originalmente por la empresa Gist-Brocades M1 Lipase® y Lipomax® y las enzimas comercializadas por la empresa Meito Sangyo KK, Japón con el nombre Lipase MY-30®, Lipase OF® y Lipase PL®, además el producto Lumafast® de la empresa Genencor.

Los agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención pueden contener además celulasas, dependiendo del fin como enzimas puras, como preparaciones enzimáticas o en forma de mezclas en las que los componentes individuales se complementan ventajosamente en relación con sus distintos aspectos de rendimiento. A estos aspectos de rendimiento pertenecen, en particular, aportaciones al rendimiento de lavado primario, al rendimiento de lavado secundario del agente (efecto anti-redeposición o inhibición de agrisado) y avivado (efecto de tejido) hasta el ejercicio de un efecto de "lavado a piedra".

Una preparación de celulasa rica en endoglucanasa (EG) fúngica útil o sus perfeccionamientos se ofrece por la empresa Novozymes con el nombre comercial Celluzyme®. Los productos disponibles también en la empresa Novozymes Endolase® y Carezyme® se basan en la EG de 50 kD o la EG de 43 kD de *H. insolens* DSM 1800. Otros productos comerciales útiles de esta empresa son Cellusoft®, Renozyme® y Celluclean®. Además se pueden emplear, por ejemplo, la EG de 20 kD de *Melanocarpus*, que se puede obtener de la empresa AB Enzymes, Finlandia, con el nombre comercial Ecostone® y Biotouch®. Otros productos comerciales de la empresa AB Enzymes son Econase® y Ecopulp®. Otras celulasas adecuadas son de *Bacillus sp.* CBS 670.93 y CBS 669.93, obteniéndose la de *Bacillus sp.* CBS 670.93 de la empresa Genencor con el nombre comercial Puradax®. Otros productos comerciales de la empresa Genencor son "Genencor detergent cellulase L" e IndiAge®Neutra.

Además, en particular para la eliminación de determinados ensuciamientos problemáticos, se pueden emplear otras enzimas que se compilan en el término hemicelulasas. A esto pertenecen, por ejemplo, mananasas, xantanliasas, pectinliasas (=pectinasas), pectinesterasas, pectatliasas, xiloglucanasas (=xilanasas), pululanastas y β -glucanasas. Están disponibles enzimas adecuadas a este respecto, por ejemplo, con el nombre Gamanase® y Pektinex AR® de la empresa Novozymes, con el nombre Rohapeck® B1 L de la empresa AB Enzymes y con el nombre Pyrolase® de la empresa Diversa Corp., San Diego, CA, EE.UU. La β -glucanasa obtenida de *Bacillus subtilis* están disponible en la empresa Novozymes con el nombre Cereflo®. Son hemicelulasas particularmente preferentes de acuerdo con la

invención mananastas que se comercializan, por ejemplo, con el nombre comercial Mannaway(R) de la empresa Novozymes y Purabrite® de la empresa Genencor.

Para aumentar el efecto de blanqueo, los agentes de acuerdo con la invención pueden contener también oxidorreductasas, por ejemplo, oxidasas, oxigenasas, catalasas (que reaccionan como peroxidasa a reducidas concentraciones de H₂O₂), peroxidasas, tales como halo-, cloro-, bromo-, lignina-, glucosa- o manganeso-peroxidasas, dioxigenasas o lacasas (fenoloxidasas, polifenoloxidasas). Como productos comerciales adecuados se han de mencionar Denilite® 1 y 2 de la empresa Novozymes. Se hace referencia a las solicitudes WO 98/45398 A1, WO 2005/056782 A2 y WO 2004/058961 A1 como sistemas de ejemplo que se pueden emplear ventajosamente para una perhidrólisis enzimática. Un sistema de blanqueo enzimático combinado que comprende una oxidasa y una perhidrolasa lo describe la solicitud WO 2005/124012. Ventajosamente se añaden adicionalmente compuestos preferentemente orgánicos, de forma particularmente preferente aromáticos, que interaccionan con las enzimas para reforzar (potenciadores) la actividad de las respectivas oxidorreductasas o para garantizar (mediadores) en caso de potenciales redox muy diferentes entre las enzimas oxidantes y los ensuciamientos el flujo de electrones.

Las enzimas empleadas de acuerdo con la invención proceden originalmente de microorganismos, por ejemplo, de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola* o *Pseudomonas* y/o se producen según procedimientos biotecnológicos en sí conocidos por microorganismos adecuados, por ejemplo, por huéspedes transgénicos de expresión de los géneros *Bacillus* o por hongos filamentosos.

La purificación de las respectivas enzimas se realiza, de forma adecuada, a través de procedimientos en sí establecidos, por ejemplo, mediante precipitación, sedimentación, concentración, filtración de las fases líquidas, microfiltración, ultrafiltración, acción de agentes químicos, acción desodorizante o combinaciones adecuadas de estas etapas.

De forma análoga a las explicaciones efectuadas anteriormente, las enzimas se pueden confeccionar de acuerdo con la invención junto con sustancias acompañantes, por ejemplo, de la fermentación o con estabilizantes.

Entre todas estas enzimas se prefieren particularmente aquellas que se han estabilizado en sí frente a una oxidación de forma comparablemente estable o, por ejemplo, mutaciones, en particular mediante sustitución, delección o inserción de uno o varios aminoácidos. Entre esto se han de indicar en particular los productos comerciales ya mencionados Everlase y Purafect® OxP como ejemplos de tales proteasas y Duramyl como ejemplo de una α -amilasa de este tipo.

El uso de un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención para la eliminación de ensuciamientos, en particular de ensuciamientos sensibles a proteasa sobre materiales textiles o superficies duras, es decir, para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, representa un objeto propio de la invención.

De hecho, los agentes de acuerdo con la invención, en particular a causa de las propiedades que se han descrito anteriormente de la proteasa contenida, se pueden usar ventajosamente para eliminar impurezas correspondientes de materiales textiles o de superficies duras. El lavado a mano, la eliminación manual de manchas de materiales textiles o de superficies duras o el uso en relación con un procedimiento a máquina representan, por ejemplo, formas de realización de este objeto de la invención.

Todos los hechos, objetos y formas de realización que se han descrito para agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención se pueden aplicar también a este objeto de la invención. Por tanto, en este punto se hace referencia expresamente a la divulgación en el punto correspondiente con la indicación de que esta divulgación se aplica también al anterior uso de acuerdo con la invención.

En formas de realización preferentes de este uso, los respectivos agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención se facilitan según una de las formas de realización descritas.

Otro objeto de la invención lo representan procedimientos para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras en los que se usa, al menos en una de las etapas del procedimiento, un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención. Por consiguiente, el procedimiento para la limpieza de materiales textiles o superficies duras está caracterizado por que en al menos una etapa del procedimiento se aplica un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención.

Aquí se incluyen procedimientos tanto manuales como a máquina, prefiriéndose los procedimientos a máquina a causa de su capacidad de control más precisa en lo referente, por ejemplo, a las cantidades y tiempos de acción empleados.

En general, los procedimientos para la limpieza de materiales textiles se caracterizan por que en varias etapas del procedimiento se aplican distintas sustancias con actividad de limpieza sobre el producto de limpieza y se eliminan mediante lavado después del tiempo de acción o por que el producto de limpieza se trata de otro modo con un agente de lavado o una solución o dilución de este agente. Lo correspondiente se aplica a procedimientos para la

limpieza de todos los materiales distintos de los materiales textiles, en particular de superficies duras. Todos los procedimientos concebibles de lavado o limpieza se pueden complementar en al menos una de las etapas del procedimiento con la aplicación de un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención y representan entonces formas de realización de la presente invención.

Todos los hechos, objetos y formas de realización que se han descrito para agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención se pueden aplicar también a este objeto de la invención. Por tanto, en este punto se hace referencia expresamente a la divulgación en el punto correspondiente con la indicación de que esta divulgación se aplica también a los anteriores procedimientos de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la invención lo representan procedimientos para la limpieza de materiales textiles o superficies duras que están caracterizados por que en al menos una etapa del procedimiento es catalíticamente activa una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 3 de al menos el 97,5 % y, cada vez más preferentemente, al menos el 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % y, de forma muy particularmente preferente, el 100 %, en particular de tal manera que la proteasa se emplea en una cantidad de 40 µg a 4 g, preferentemente de 50 µg a 3 g, de forma particularmente preferente de 100 µg a 2 g y de forma muy particularmente preferente de 200 µg a 1 g por aplicación. Todos los hechos, objetos y formas de realización que se han descrito para agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención se pueden aplicar también a este objeto de la invención. Por tanto, en este punto se hace referencia expresamente a la divulgación en el punto correspondiente con la indicación de que esta divulgación se aplica también a los anteriores procedimientos de acuerdo con la invención.

Ya que las proteasas empleadas en los agentes de acuerdo con la invención naturalmente ya poseen una actividad hidrolítica y despliegan la misma también en medios que por lo demás no poseen ningún poder de limpieza tal como, por ejemplo, en un mero tampón, una única y/o la única etapa de un procedimiento de este tipo puede consistir en que, en caso deseado, como un único componente con actividad de limpieza se ponga en contacto una proteasa de este tipo con el ensuciamiento, preferentemente en una solución de tampón o en agua. Esto representa otra forma de realización de este objeto de la invención.

Representan formas de realización alternativas de este objeto de la invención también procedimientos para el tratamiento de materias primas textiles o para el acondicionado de materiales textiles en los que, en al menos una etapa del procedimiento, es activa una proteasa empleada en agentes de acuerdo con la invención. Entre estos se prefieren procedimientos para materias primas textiles, fibras o materiales textiles con constituyentes naturales y de forma muy particular para aquellos con algodón o seda.

A este respecto se puede tratar, por ejemplo, de procedimientos en los que se preparan materiales para el procesamiento en materiales textiles, por ejemplo, para el apresto anti-afiltrado o, por ejemplo, de procedimientos que enriquecen la limpieza de materiales textiles usados con un componente acondicionador. A causa del efecto que se ha descrito anteriormente de proteasas en materias primas naturales que contienen proteína, en formas de realización preferentes se trata de procedimientos para el tratamiento de materias primas textiles, fibras o materiales textiles con constituyentes naturales, en particular con algodón o seda.

Las proteasas empleadas en agentes de acuerdo con la invención se pueden emplear, de forma correspondiente a las anteriores explicaciones, ventajosamente en agentes de lavado y limpieza así como procedimientos de acuerdo con la invención, en particular procedimientos de lavado y limpieza. Por tanto, se pueden usar para eliminar de materiales textiles o de superficies duras ensuciamientos que contienen proteína o sensibles a proteasa.

Por tanto, otro objeto de la invención lo forma el uso de una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con una secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 3 de al menos el 97,5 % y, cada vez más preferentemente, de al menos el 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % y de forma muy particularmente preferente del 100 % para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras. Preferentemente se emplea la proteasa en una cantidad de 40 µg a 4 g, preferentemente de 50 µg a 3 g, de forma particularmente preferente de 100 µg a 2 g y de forma muy particularmente preferente de 200 µg a 1 g por aplicación. Todos los hechos, objetos y formas de realización que se han descrito para agentes de lavado o limpieza de acuerdo con la invención se pueden aplicar también a este objeto de la invención. Por tanto, en este punto se hace referencia expresamente a la divulgación en el punto correspondiente con la indicación de que esta divulgación se aplica también al anterior uso de acuerdo con la invención. En una forma de realización preferente de este uso se facilitan las respectivas enzimas en el marco de un agente de lavado o limpieza de acuerdo con la invención.

Ejemplos

Todas las etapas de trabajo de biología molecular siguen procedimientos convencionales, tal como están indicados, por ejemplo, en el libro de texto de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold

Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, u obras pertinentes comparables. Las enzimas y sistemas modulares (kits) se emplearon según las indicaciones de los respectivos fabricantes.

Ejemplo 1

5 Aislamiento e identificación de la cepa bacteriana proteolíticamente activa

10 0,1 g de una muestra de suelo se suspendieron en 1 ml de solución al 0,9 % de NaCl estéril y se sembraron en placas de agar que contenían leche en polvo (1,5 % de agar, 0,1 % de K₂HPO₄, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de peptona, 1 % de leche en polvo, 0,02 % de MgSO₄*7H₂O, 0,4 % Na₂CO₃, pH 10) y se incubaron a 30 °C. Gracias a un halo claro se aisló una bacteria proteolíticamente activa que se identificó por la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) como *Bacillus pumilus* (ID 08-101).

Ejemplo 2

15 Aislamiento y clonación de la nueva serina proteasa del suelo

20 La bacteria proteolíticamente activa se cultivó en medio TBY (0,5 % de NaCl, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de triptona, pH 7,4) durante 16 h a 30 °C. El ADN total de esta bacteria se preparó según métodos convencionales, se trató con la enzima de restricción Sau 3A y se clonó en un vector de *Bacillus* (derivado del pBC16; Bernhard *et al.* (1978), J. Bacteriol., Volumen 133 (2), pág. 897 y siguientes). Este vector se introdujo mediante transformación en la cepa hospedadora negativa a proteasa *Bacillus subtilis* DB 104 (Kawamura y Doi (1984), J. Bacteriol., volumen 160 (1), pág. 442-444).

25 En primer lugar, los transformantes se regeneraron en medio DM3 y después se traspasaron por inoculación a placas de agar que contenían leche en polvo (placas de leche desnatada TBY; véase el Ejemplo 1). Los clones proteolíticamente activos se identificaron mediante sus halos de lisis. De los clones proteolíticamente activos obtenidos se seleccionó uno cuyo plásmido (vector) se aisló y el fragmento génico (inserto) contenido en este vector se secuenció según procedimientos convencionales.

30 El inserto contiene una fase de lectura abierta de aproximadamente 1,2 kb, cuya secuencia de ADN codifica una proteasa del tipo subtilisina. La secuencia se amplificó mediante PCR, se clonó en el vector de *E. coli* pUC19 y se depositó de acuerdo con el Tratado de Budapest en la DSMZ con el número DSM 21890.

35 Ejemplo 3

Establecimiento del rendimiento de limpieza de un agente de lavado líquido disponible en el mercado que contiene la proteasa

40 Para este ejemplo se emplearon materiales textiles ensuciados de forma normalizada que se habían obtenido de EMPA Testmaterialien AG (St. Gallen, Suiza), de wfk Testgewebe GmbH (Brüggen-Bracht, Alemania) o del Center For Testmaterials (CFT, Vlaardingen, Países Bajos). A este respecto se usaron los siguientes ensuciamientos y materiales textiles:

- 45 A: hierba sobre algodón: producto N° 164 de la empresa Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza;
B: aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón: producto N° PC-10 de CFT (Center For Testmaterials) B. V. Vlaardingen, Países Bajos;
50 C: leche chocolateada/negro de humo sobre algodón: producto N° C-03 de CFT (Center For Testmaterials) B. V. Vlaardingen, Países Bajos;
D: sangre-leche/tinta china sobre algodón: producto N° C-05 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B. V. Vlaardingen, Países Bajos

55 Con este material de ensayo se examinaron distintas formulaciones de agente de lavado en relación con su rendimiento de limpieza. Para esto, las preparaciones se lavaron durante 60 minutos a una temperatura de 40 °C. La dosificación se encontraba en 5,9 g del agente de lavado por litro de baño de lavado. Se lavó con agua urbana con una dureza de agua de aproximadamente 16° de dureza alemana.

60 Como agente de lavado de control sirvió una formulación de base de agente de lavado con la siguiente composición (todas las indicaciones en porcentaje en peso): 0,3-0,5 % de goma xantana, 0,2-0,4 % de agente antiespumante, 6-7 % de glicerol, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (sulfato de éter de alcohol graso), 24-28 % de tensioactivos no iónicos, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato sódico (dihidrato), 2-4 % de carbonato de sodio, 14-16 % de ácidos grasos de nuez de coco, 0,5 % de HEDP (ácido 1-hidroxietan-(1,1-di-fosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de agente de aclaramiento óptico, 0-0,001 % de colorante, resto agua desmineralizada. La formulación de base de agente de lavado se mezcló para las distintas series de ensayo con la misma actividad (5 UP/ml de concentración final) con las siguientes proteasas: proteasa que comprende una

secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 3 (preparación 1), proteasa de *Bacillus pumilus* de acuerdo con el documento WO2007/131656 (preparación 2) y la variante mejorada en rendimiento F49 de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con el documento WO 95/23221 (preparación 3).

- 5 Después del lavado se midió el grado de blanco de los materiales textiles lavados. La medición se realizó en un espectrómetro Minolta CM508d (tipo de luz D65, 10°). El aparato se calibró previamente con un patrón de blanco suministrado. Los resultados obtenidos son las remisiones de diferencia entre un proceso de lavado con un agente de lavado que contiene una proteasa y un ciclo de lavado de control llevado a cabo en paralelo con un agente de lavado sin proteasa. Los resultados están resumidos en la siguiente Tabla 1 y permiten una deducción directa
- 10 acerca de la aportación de la enzima respectivamente contenida al rendimiento de limpieza del agente usado.

Tabla 1: resultados de lavado con un agente de lavado líquido a 40 °C

Ensuciamiento	Preparación 1	Preparación 2	Preparación 3
A	6,5	4,5	4,8
B	9,1	7,8	8,5
C	7,2	4,3	5,7
D	18,4	15,5	16,6

- 15 Es evidente que un agente de lavado de acuerdo con la invención muestra un mejor rendimiento de limpieza en comparación con un agente de lavado con una proteasa de *Bacillus pumilus* que presenta una secuencia similar de aminoácidos, así como incluso en comparación con un agente de lavado que ya contiene una variante de proteasa mejorada en rendimiento que no es una molécula de tipo natural.

REIVINDICACIONES

1. Agente de lavado o limpieza que comprende una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 3 de al menos el 97,5 % y, cada vez más preferentemente, al menos el 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % y, de forma muy particularmente preferente, el 100 %, así como al menos otro ingrediente de agente de lavado.
2. Agente de lavado o limpieza de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el otro ingrediente de agente de lavado está seleccionado del grupo compuesto de sustancias soporte, tensioactivos con actividad superficial, blanqueadores a base de compuestos de peroxígeno orgánicos y/o inorgánicos, activadores de blanqueo, disolventes orgánicos miscibles con agua, enzimas, secuestrantes, electrolitos, reguladores del pH y otros coadyuvantes, tales como agentes de aclaramiento óptico, inhibidores de agrisado, reguladores de espuma así como colorantes y fragancias así como combinaciones de los mismos.
3. Agente de lavado o limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que está presente en forma sólida, en particular como polvo suelto con un peso aparente de 300 g/l a 1200 g/l, en particular de 500 g/l a 900 g/l.
4. Agente de lavado o limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que está presente en forma líquida, en forma de gel o pastosa.
5. Agente de lavado o limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la proteasa está envuelta con una sustancia impermeable para la proteasa a temperatura ambiente y/o en ausencia de agua.
6. Agente de lavado o limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende al menos otra enzima, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanas, xantanasa, β -glucosidasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa, así como preferentemente sus mezclas.
7. Uso de un agente de lavado o limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 para la eliminación de ensuciamientos sensibles a proteasa sobre materiales textiles o superficies duras.
8. Procedimiento para la limpieza de materiales textiles o superficies duras, caracterizado por que en al menos una etapa del procedimiento se aplica un agente de lavado o limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Procedimiento para la limpieza de materiales textiles o superficies duras, caracterizado por que en al menos una etapa del procedimiento es catalíticamente activa una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 3 de al menos el 97,5 % y, cada vez más preferentemente, de al menos el 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % y, de forma muy particularmente preferente, el 100 %, en particular de tal manera que la proteasa se emplea en una cantidad de 40 μ g a 4 g, preferentemente de 50 μ g a 3 g, de forma particularmente preferente de 100 μ g a 2 g y de forma muy particularmente preferente de 200 μ g a 1 g por aplicación.
10. Uso de una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 3 de al menos el 97,5 % y, cada vez más preferentemente, de al menos el 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % y, de forma muy particularmente preferente, el 100 % para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, en particular de tal manera que la proteasa se emplea en una cantidad de 40 μ g a 4 g, preferentemente de 50 μ g a 3 g, de forma particularmente preferente de 100 μ g a 2 g y de forma muy particularmente preferente de 200 μ g a 1 g por aplicación.