

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 543**

51 Int. Cl.:

**C11D 3/04** (2006.01)

**C11D 3/20** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

**C11D 3/16** (2006.01)

**C11D 3/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2008 E 08718284 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2139979**

54 Título: **Soluciones enzimáticas estables y método de fabricación**

30 Prioridad:

**27.03.2007 DK 200700472**

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

**24.04.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ANDERSEN, KIM BRUNO**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 534 543 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**

Soluciones enzimáticas estables y método de fabricación.

5 Campo de la invención

[0001] La presente divulgación se refiere a una composición líquida que comprende o incluye una enzima, un inhibidor y un potenciador del inhibidor.

10 Antecedentes

[0002] Se conocen muy bien los problemas de estabilidad de almacenamiento en líquidos que contienen enzimas como por ejemplo detergentes líquidos que contienen enzimas. Esto es especialmente cierto en detergentes líquidos que contienen proteasas.

15

[0003] El estado de la técnica se ha ocupado extensivamente de la mejora de la estabilidad de almacenamiento, añadiendo por ejemplo un inhibidor de proteasa.

20

[0004] Se sabe que el ácido bórico y los ácidos borónicos inhiben reversiblemente las enzimas proteolíticas. Se proporciona una discusión de la inhibición de una serina proteasa, subtilisina, por parte del ácido borónico en Molecular & Cellular Biochemistry 51, 1983, pp. 5-32.

25

[0005] Los ácidos borónicos tienen capacidades muy diferentes como inhibidores de subtilisina. Los ácidos borónicos que contienen solo grupos alquilo como por ejemplo metilo, butilo o 2-ciclohexiletilo son inhibidores pobres siendo el ácido metilborónico el inhibidor más pobre, mientras que los ácidos borónicos con grupos aromáticos como por ejemplo fenilo, 4-metoxifenilo o 3,5-diclorofenilo son buenos inhibidores y el ácido 3,5-diclorofenilborónico es un inhibidor particularmente eficaz (ver Keller et al, Biochem. Biophys. Res. Com. 176, 1991, pp. 401-405).

30

[0006] También se sabe que los ácidos aril borónicos que tienen una sustitución en la posición 3 en relación al boro son inhibidores de proteasa reversibles. En WO 92/19707, se describe el ácido acetamidofenilo borónico como un inhibidor de enzimas proteolíticas.

35

[0007] Además, EP 0 832 174 describe los derivados de ácido fenil borónico sustituidos en la posición para con un >C=O adyacente al ácido fenil borónico que poseen buenas capacidades como estabilizadores enzimáticos en líquidos.

[0008] WO 2004/009752 A divulga composiciones líquidas de detergentes alcalinos que incluyen un ácido aril borónico, una proteasa y sales de ácido fórmico similares a sales, EDTA 4Na, surfactantes aniónicos, sulfonato de xileno de sodio. El pH de las composiciones del documento es de 8,5 a 11.

40

[0009] Todavía se puede mejorar la formulación, fabricación y envase de enzima de las composiciones líquidas de enzimas que incluyen enzimas sensibles para proporcionar composiciones de detergente que no pierden actividad enzimática durante el transporte y el almacenamiento.

45

**Resumen de la invención**

[0010] Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición enzimática líquida con estabilidad enzimática mejorada. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la fabricación de la composición enzimática líquida.

50

[0011] Se ha descubierto que añadiendo un potenciador del inhibidor como por ejemplo una sal soluble a una composición enzimática líquida que incluye una enzima y un inhibidor como por ejemplo un ácido fenil borónico o un derivado de

55

[0012] ácido fenil borónico se mejora significativamente el efecto de los inhibidores y por lo tanto se mejora la estabilidad de almacenamiento de la enzima con respecto a la actividad enzimática.

60

[0013] La presente invención proporciona una composición enzimática líquida que incluye un constituyente enzimático, un constituyente de ácido fenil borónico o un derivado del mismo y un constituyente disuelto, en la cual el constituyente de sal comprende un anión que es cloruro, sulfato, nitrato o acetato, y el constituyente de sal está presente en una cantidad de 0,5 a 10% en peso de la composición total.

65

[0014] La presente invención se refiere además a la fabricación de la composición enzimática líquida y a su uso.

[0015] Se lograron los objetivos de la presente invención a través de la provisión de una composición líquida que incluye un constituyente enzimático, un constituyente de ácido fenil borónico o un derivado del mismo, y un constituyente de sal disuelto. En formas de realización, el constituyente enzimático es una proteasa como por ejemplo una serina proteasa.

El constituyente de sal puede incluir cationes como por ejemplo Cu, Ca, Mg, Zn, Na, K, NH<sub>4</sub> y combinaciones de los mismos. En formas de realización, el constituyente de sal puede incluir cationes seleccionados del grupo que está compuesto por Mg, Zn, NH<sub>4</sub> y combinaciones de los mismos.

5 [0016] En una forma de realización específica se seleccionan los cationes del grupo que está compuesto por Cu, Ca, Mg, Zn, Na, K, NH<sub>4</sub> y se seleccionan los aniones del grupo que está compuesto por cloruro, sulfato, nitrato.

[0017] En algunas formas de realización, el pH de la composición líquida es de 7 a 10,5 y en otras formas de realización, el pH de la composición líquida es de 8 a 9,5.

10

[0018] También se logran los objetivos de la presente divulgación a través de la provisión de una composición detergente, como por ejemplo una composición detergente para ropa o una composición lavavajillas.

15

[0019] También se pueden alcanzar los objetivos de la presente invención a través de la provisión de un proceso para la fabricación de una composición líquida que incluye las fases de: a) proporcionar un líquido; b) añadir una sal hidrosoluble al líquido de a); c) añadir a a) una enzima y un ácido fenil borónico o un derivado del mismo, simultáneamente con b) o tras añadirlos a b); d) y mezclar la composición líquida. En formas de realización, el proceso también puede incluir la fase de ajuste del pH de 7 para 9,5, o de 8 para 9.

20

[0020] También se logran los objetivos de la presente invención a través de la limpieza de un objeto con composiciones de acuerdo con la presente divulgación.

[0021] También se logran los objetivos de la presente invención utilizando un constituyente de sal para potenciar o mejorar el efecto inhibitor de un ácido fenil borónico o un derivado del mismo en una composición enzimática líquida.

25

### Definiciones

[0022] Como se utiliza en el presente documento el término "% HR" se refiere a la humedad relativa del aire. 100% HR es aire saturado con humedad de agua a una temperatura fija y el % HR refleja el porcentaje de saturación de humedad del aire.

30

[0023] El término "humedad constante" (que en el contexto de la invención a veces se abrevia como HC) de un compuesto o sustancia se refiere al % de HR del aire atmosférico en equilibrio con una solución acuosa saturada del compuesto en contacto con la fase sólida del compuesto, todos confinados en un espacio cerrado a una determinada temperatura. Esta definición está de acuerdo con "Handbook of chemistry and physics" CRC Press, Inc., Cleveland, USA, 58th edition, p E46, 1977-1978. Por consiguiente HC<sub>20 °C</sub> = 50% para un compuesto significa que el aire con 50% de humedad estará en equilibrio con una solución acuosa saturada del compuesto a 20°C. Por consiguiente, el término humedad constante es una medida de las propiedades higroscópicas de un compuesto.

35

[0024] El término "pH" de un compuesto en el contexto de la invención debe entenderse como el pH de una solución acuosa 10% p/p del compuesto.

40

### Descripción detallada de las formas de realización preferidas

45

[0025] La presente divulgación se refiere a composiciones enzimáticas líquidas que incluyen uno o varios constituyentes enzimáticos, uno o varios inhibidores y uno o varios potenciadores del inhibidor. Se ha descubierto que la sal funciona como un potenciador del inhibidor en las composiciones enzimáticas líquidas si el inhibidor es ácido fenilo borónico o un derivado.

50

[0026] Sin desear ligarse a cualquier teoría de la presente divulgación se cree que el efecto inhibitor de los derivados de ácido fenil borónico es afectado negativamente por una combinación de pH alcalino y contenido de agua elevado (actividad acuosa) en composiciones detergente. A pH alcalino el ácido fenil borónico se carga a través de su reacción antibase aumentando la solubilidad del agua. Además, esto disminuye la afinidad de la molécula hacia el sitio fotolítico que tiene propensión para inhibir. El equilibrio (1) se desplaza hacia la proteasa no inhibida (derecha):

55



[0027] EZ es una proteasa, I es el inhibidor y EZ[I] es el complejo inactivado.

60

[0028] Al reducir la solubilidad del inhibidor en la matriz del detergente el equilibrio (1) se desplazará hacia el complejo de proteasa inhibido (izquierda) - reduciendo la probabilidad de que el inhibidor precipite fuera de la solución.

65

[0029] El anillo bencénico es altamente hidrofóbico - y por lo tanto se cree que la adición de uno o más constituyentes de sal a una composición detergente hará que sea desfavorable para el anillo bencénico quedarse en la solución, y hace que sea más probable que interactúe con el sitio activo de una proteasa.

[0030] Se cree además que el efecto potenciador puede agregar algunos pequeños cambios estructurales a la proteasa, lo que facilita una mejor correspondencia del inhibidor en el sitio activo.

### El constituyente inhibidor

5

[0031] Según la presente divulgación están presentes en las composiciones uno o varios inhibidores. El inhibidor enzimático de la presente invención es un ácido fenil borónico y/o un derivado del mismo.

10

[0032] La presente invención abarca composiciones enzimáticas líquidas que comprenden ácido fenil borónico o derivados del mismo.

[0033] En una forma de realización específica de la presente invención el inhibidor es un derivado de ácido naftaleno borónico.

15

[0034] El constituyente inhibidor está presente en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto beneficioso. En formas de realización se añade el constituyente inhibidor en una cantidad de 0,1 a 20 % (p/p) de la composición líquida total, en algunas formas de realización en una cantidad de 0,5 a 8 % (p/p) de la composición total, y en algunas formas de realización en una cantidad de 1 a 5% (p/p) de la composición total.

20

[0035] En una forma de realización específica de la presente invención la cantidad de inhibidor es superior a 1 % (p/p) de la composición líquida total. En una forma de realización más específica de la presente invención la cantidad de constituyente inhibidor es superior a 1,5 % (p/p) de la composición líquida total. En una forma de realización aún más específica de la presente invención la cantidad de inhibidor es superior a 2 % (p/p) de la composición líquida total.

25

[0036] En una forma de realización específica de la presente invención se añade una cantidad de inhibidor a la composición enzimática líquida de al menos 0,1% (p/p) de la composición total. En una forma de realización más específica de la presente invención se añade el inhibidor a la composición enzimática líquida en una cantidad de al menos 0,5% (p/p) de la composición total. En una forma de realización más específica se añade el inhibidor a la composición enzimática líquida en una cantidad de al menos 1% (p/p) de la composición total. En una forma de realización aún más específica de la presente invención se añade el constituyente inhibidor a la composición enzimática líquida en una cantidad de al menos 1,5 % (p/p) de la composición total.

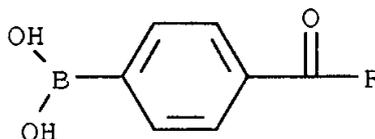
30

[0037] En una forma de realización específica de la presente invención la cantidad de inhibidor que se añade a la composición enzimática líquida es una cantidad inferior a 20% (p/p) de la composición total. En una forma de realización más específica de la presente invención la cantidad de inhibidor que se añade a la composición enzimática líquida es una cantidad inferior a 15% (p/p) de la composición total. En una forma de realización aún más específica de la presente invención la cantidad de inhibidor que se añade a la composición de líquido enzimático es inferior a 10% (p/p) de la composición total. En una forma de realización todavía más específica de la presente invención la cantidad de inhibidor que se añade al aditivo del líquido enzimático es inferior a 5% (p/p) de la composición total.

40

[0038] Algunos ejemplos no limitativos adecuados de derivados de ácido fenil borónico que se pueden usar según la presente divulgación tienen la siguiente fórmula:

45



en la cual se selecciona R del grupo que está compuesto por hidrógeno, hidroxil, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo sustituido, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alqueno y C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alqueno sustituido.

50

[0039] En una forma de realización de la presente divulgación una composición líquida incluye un constituyente enzimático y un inhibidor enzimático derivado de ácido fenil borónico de la fórmula descrita anteriormente, en la que R es un C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo, en particular en la que R es CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub> CH<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub> CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>, o en la que R es hidrógeno. En una forma de realización de la presente divulgación el inhibidor de la enzima es ácido 4-formil-fenil-borónico (4-FPBA).

55

[0040] En formas de realización, algunos ejemplos no limitativos adecuados de inhibidores incluyen compuestos seleccionados del grupo que está compuesto por:

60

ácido tiofeno-2 borónico, ácido tiofeno-3 borónico, ácido acetamidofenil borónico, ácido benzofurano-2 borónico, ácido naftaleno-1 borónico, ácido naftaleno-2 borónico, 2-FPBA, 3-FPBA, 4-FPBA, ácido 1-tiantreno borónico, ácido 4-dibenzofurano borónico, ácido 5-metiltiofeno-2 borónico, ácido tionaftreo borónico, ácido furan-2 borónico, ácido furan-3 borónico, ácido 4,4 bifenil-diborónico, ácido 6-hidroxi-2-naftaleno, ácido 4-(metiltio) fenil borónico, ácido 4 (trimetil-silil) fenil borónico, ácido 3-bromotiofeno borónico, ácido 4-metiltiofeno borónico, ácido 2-naftil borónico, ácido 5-bromotifeno borónico, ácido 5-clorotiofeno borónico, ácido dimetiltiofeno borónico, ácido 2-bromofenil borónico, ácido 3-clorofenil borónico, ácido 3-metoxi-2-tiofeno, ácido p-metil-feniletíl borónico, ácido 2-tiantreno

65

borónico, ácido di-benzotiofeno borónico, ácido 4-carboxifenil borónico, ácido 9-antril borónico, ácido 3,5 diclorofenil borónico, anhídrido difenil borónico, ácido o-clorofenil borónico, ácido p-clorofenil borónico  
 ácido m-bromofenil borónico, ácido p-bromofenil borónico, ácido p-flourofenil borónico, ácido p-tolil borónico, ácido o-tolil borónico, ácido octil borónico, ácido 1,3,5 trimetilofenil borónico, ácido 3-cloro-4-flourofenil borónico, ácido 3-aminofenil borónico, ácido 3,5-bis-(triflourometil) fenil borónico, ácido 2,4 diclorofenil borónico, ácido 4-metoxifenil borónico, y combinaciones de los mismos

5

10

[0041] Se describen ejemplos no limitativos adicionales adecuados de derivados de ácido borónico que se pueden usar adecuadamente como inhibidores en US 4,963,655, US 5,159,060, WO 95/12655, WO 95/29223, WO 92/19707, WO 94/04653, WO 94/04654, US 5442100, US 5488157 y US 5472628 (incorporadas en su totalidad en el presente documento por referencia).

15

[0042] La composición comprende una enzima, un constituyente inhibidor, en la que el constituyente es o ácido fenil borónico o un derivado y un constituyente potenciador del inhibidor.

#### Constituyente potenciador del inhibidor

20

[0043] El potenciador del inhibidor es una sal disuelta en el cual el constituyente de sal comprende un anión que es cloruro, sulfato, nitrato o acetato. El potenciador del inhibidor está presente en una cantidad de 0,5 a 10 % en peso de la composición total.

25

[0044] De acuerdo con la presente divulgación, están presentes en composiciones uno o varios potenciadores del inhibidor. El potenciador del inhibidor es hidrosoluble. En el contexto de la presente divulgación el potenciador del inhibidor puede tener una solubilidad de al menos 1 gramo en 100 gramos de agua a 20 °C, como por ejemplo una solubilidad de al menos 2 gramos en 100 gramos de agua a 20 °C. El potenciador del inhibidor impulsor está en forma disuelta, es decir la sal está disuelta y por lo tanto está en la forma iónica.

30

[0045] El potenciador del inhibidor es capaz de aumentar o mejorar el efecto que el constituyente inhibidor tiene en el constituyente enzimático. En formas de realización, el potenciador del inhibidor puede ser una o varios sales solubles. Algunos ejemplos no limitativos de cationes adecuados son amonio o iones metálicos y iones metálicos alcalinos o alcalinotérreos, como por ejemplo sodio, potasio, magnesio, calcio, cinc o aluminio y combinaciones de los mismos. En particular se pueden utilizar las sales metálicas alcalinas o alcalinotérreas de sulfato, nitrato, cloruro o acetato, y combinaciones de los mismos. Algunos ejemplos no limitativos específicos incluyen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KHSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , acetato de magnesio, y combinaciones de los mismos.

35

40

[0046] La sal también puede ser una sal hidratada, es decir un hidrato de sal cristalino con agua(s) de cristalización unidas, como se describe en WO 99/32595. Algunos ejemplos de sales hidratadas incluyen heptahidrato de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), heptahidrato de sulfato de cinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), hexahidrato de nitrato de magnesio ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), y tetrahidrato de acetato de magnesio.

45

[0047] En una forma de realización específica de la presente invención se selecciona la sal del grupo que está compuesto por  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ . En otra forma de realización específica de la presente invención se selecciona la sal del grupo que está compuesto por  $\text{MgCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ .

50

[0048] En una forma de realización específica de la presente invención se selecciona la sal del grupo que está compuesto por  $\text{MgCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ .

55

[0049] En otra forma de realización específica de la presente invención se selecciona la sal del grupo que está compuesto por  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ .

[0050] En otra forma de realización específica de la presente invención se selecciona la sal del grupo que está compuesto por  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ .

[0051] En otra forma de realización específica de la presente invención se selecciona la sal del grupo que está compuesto por  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

60

[0052] En una forma de realización específica de la presente invención se selecciona el catión de Mg, Zn, Na, K o  $\text{NH}_4$ . En una forma de realización más específica de la presente invención se selecciona el catión de Mg o  $\text{NH}_4$ .

65

[0053] En una forma de realización específica de la presente invención se selecciona el anión de cloruro, sulfato y nitrato.

[0054] Se puede añadir el potenciador del inhibidor al detergente líquido en la forma líquida o sólida. Si se añade el

potenciador del inhibidor en la forma líquida se añade específicamente en forma de un líquido acuoso.

[0055] En una forma de realización la composición no comprende fosfato de dihidrógeno de sodio o trihidrato de acetato de sodio.

[0056] En formas de realización, las composiciones que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación contienen uno o varios potenciadores del inhibidor en una cantidad eficaz a fin de mejorar la estabilidad y/o aumentar la vida útil de almacenamiento. Como se utiliza en el presente documento "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un constituyente potenciador del inhibidor según la presente divulgación suficiente para inducir un beneficio positivo específico en la estabilidad o en la vida útil de almacenamiento de la composición enzimática líquida según la presente divulgación. El beneficio positivo puede ser de naturaleza cosmética, o relacionado con la actividad, o una combinación de las dos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la actividad residual de la enzima bajo condiciones estresadas puede ser 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces más larga que cuando se compara con composiciones similares que no poseen el potenciador del inhibidor. Como se utiliza en el presente documento condiciones estresadas incluyen, entre otras cosas, almacenamiento a una temperatura elevada de 40 °C durante cuatro semanas. En formas de realización, se logra el beneficio positivo poniendo en contacto composiciones enzimáticas líquidas con una combinación de constituyentes inhibidores y constituyentes potenciadores del inhibidor, para mejorar la estabilidad y/o vida útil de almacenamiento de la composición enzimática líquida.

[0057] Por ejemplo, en algunas formas de realización la actividad residual de la enzima bajo condiciones estresadas puede ser superior a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, cuando las condiciones estresadas incluyen almacenamiento a una temperatura elevada de 40 °C durante cuatro semanas.

[0058] La concentración específica de constituyente potenciador del inhibidor que se aplica depende normalmente de la finalidad para la cual se aplicará. Por ejemplo, la concentración puede variar dependiendo del tipo de enzima usada y de la gravedad de los problemas de estabilidad y/o de almacenamiento que se pretenden solucionar.

[0059] La cantidad de sal que se añade al detergente es, en una forma de realización específica, 0,8 a 5% en peso. La cantidad de sal que se añade al detergente es, en una otra forma de realización aún más específica, 1 a 3% en peso.

[0060] La cantidad de iones cationes presentes en el detergente es, en una forma de realización específica, 0,005 a 10% en peso. La cantidad de iones cationes presentes en el detergente es, en una forma de realización específica, 0,05 a 4% en peso. La cantidad de iones cationes presentes en el detergente es, en una forma de realización específica, 0,1 a 2% en peso.

### Enzimas

[0061] Las enzimas que se pueden estabilizar según la invención se denominan en el contexto de la presente invención "enzimas deterativas", que como se utiliza en el presente documento significa cualquier enzima que ejerce sus efectos durante el ciclo de lavado, teniendo por ejemplo un efecto de limpieza, de cuidado de los tejidos, de antireposición y de eliminación de manchas en una aplicación de lavado y que se añade para ese fin.

[0062] Según la invención la composición líquida contiene al menos una enzima. La enzima puede ser cualquier enzima disponible comercialmente, en particular una enzima que se selecciona del grupo que está compuesto por proteasas, amilasas, lipasas, celulasas, liasas, oxidorreductasas y cualquier mezcla de las mismas. También se incluyen las mezclas de enzimas de la misma clase (por ejemplo proteasas).

[0063] Según la invención se prefiere una composición líquida que comprende una proteasa. En una forma de realización específica se prefiere una composición líquida que comprende dos o más enzimas en la cual la primera enzima es una proteasa y la segunda enzima se selecciona del grupo que está compuesto por amilasas, lipasas, celulasas, liasas y oxidorreductasas. En una forma de realización más específica la segunda enzima es una lipasa.

[0064] Deberá entenderse que las variantes enzimáticas (producidas, por ejemplo, usando técnicas recombinantes) se incluyen en la definición del término "enzima". Se divulgan algunos ejemplos de esas variantes enzimáticas, por ejemplo en EP 251,446 (Genencor), WO 91/00345 (Novo Nordisk), EP 525,610 (Solvay) y WO 94/02618 (Gist-Brocades NV).

[0065] Se pueden clasificar las enzimas con base en el manual Enzyme Nomenclature del NC-IUBMB, 1992, ver también la página ENZYME en Internet: <http://www.expasy.ch/enzyme/>. ENZYME es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de las enzimas. Se basa principalmente en las recomendaciones del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB), Academic Press, Inc., 1992, y describe cada tipo de enzima caracterizada a la cual se ha atribuido un número EC (Comisión Enzimática) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Esta nomenclatura enzimática de la IUB-MB se basa en su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; esa clasificación no refleja las características estructurales de estas enzimas.

[0066] Se ha propuesto hace unos años otra clasificación de determinadas enzimas hidrolasa glucósida, como por

ejemplo endoglucanasa, xilanasa, galactanasa, mananasa, dextranasa y alfa-galactosidasa, en familias que se basan en similitudes de secuencias de aminoácidos. Actualmente forman parte de 90 familias diferentes: ver la página de Internet de CAZY(ModO) (Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate - Active Enzymes server en el URL:

- 5 <http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy/CAZY/index.html> (artículos correspondientes: Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat y B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12 ; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita y T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokio, pp. 15-23 ).

[0067] El aditivo enzimático líquido comprende preferiblemente una proteasa, como por ejemplo una serina proteasa.

- 15 [0068] Proteasas: las proteasas adecuadas incluyen aquellas cuyo origen es animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos. La proteasa puede ser una serina proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa similar a la tripsina. Algunos ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente las que derivan de Bacillus, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en WO 89/06279). Algunos ejemplos de proteasas similares a la tripsina son tripsina (por ejemplo de origen porcino o bovino) y la proteasa Fusarium descrita en WO 89/06270. En una forma de realización específica de la presente invención la proteasa es una serina proteasa. Las serina proteasas o las serina endopeptidasas (nombre más reciente) son una clase de peptidasas que se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en el centro activo de la enzima.

- 25 [0069] Serina proteasas: una serina proteasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces péptidos, y en la cual existe un residuo de serina esencial en el sitio activo (White, Handler y Smith, 1973 "Principles of Biochemistry," Fifth Edition, McGraw-Hill Book Company, NY, pp. 271-272 ).

- 30 [0070] Las serina proteasas bacterianas tienen pesos moleculares en la gama de 20,000 a 45,000 Daltons. Son inhibidas por diisopropilfluorofosfato. Hidrolizan ésteres de terminal simple y son similares en términos de actividad a la quimiotripsina eucariótica, que también es una serina proteasa. Un término más restricto, proteasa alcalina, que abarca un subgrupo, refleja el pH alto ideal de algunas de las serina proteasas, de pH 9,0 a 11,0 (para un análisis, ver Priest (1977) Bacteriological Rev. 41 711-753).

- 35 [0071] Subtilasas: Siezen et al. (1991), Protein Eng., 4 719-737 han propuesto un subgrupo de serina proteasas designadas provisionalmente subtilasas. Se definen a través de análisis de homología de más de 40 secuencias de aminoácidos de serina proteasas que anteriormente se denominaban proteasas similares a la subtilisina. Se definió anteriormente una subtilisina como una serina proteasa producida por bacterias u hongos gram positivos, y según Siezen et al. ahora es un subgrupo de las subtilasas. Se han identificado una gran variedad de subtilisinas, y se ha determinado la secuencia de aminoácidos de varias subtilisinas. Estas incluyen más de seis subtilisinas de cepas de Bacillus, particularmente, subtilisina 168, subtilisina BPN', subtilisina Carlsberg, subtilisina Y, subtilisina amylosacchariticus, y mesentericopeptidasa (Kurihara et al. (1972) J. Biol. Chem. 247 5629-5631 ; Wells et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11 7911-7925 ; Stahl y Ferrari (1984) J. Bacteriol. 159 811-819 , Jacobs et al. (1985) Nucl. Acids Res. 13 8913-8926 ; Nedkov et al. (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366 421-430 , Svendsen et al. (1986) FEBS Lett. 45 196 228-232), una subtilisina de un actinomycetales, termitasa de Thermoactinomyces vulgaris (Meloun et al. (1985) FEBS Lett. 198 195-200), y una subtilisina fúngica, proteinasa K de Tritirachium album (Jany y Mayer (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366 584-492). Se ha reproducido a continuación la Tabla I de Siezen et al. para referencia adicional.

- 50 [0072] Las subtilisinas están bien caracterizadas físicamente y químicamente. Además del conocimiento de la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de estas enzimas, se han determinado más de 50 estructuras de rayos X de alta resolución de subtilisinas que delinean la unión de sustrato, el estado de transición, los productos, al menos tres inhibidores de proteasa diferentes y definen las consecuencias estructurales para la variación natural (Kraut (1977) Ann. Rev. Biochem. 46 331-358).

- 55 [0073] Un subgrupo de las subtilasas, I-S1, comprende las subtilisinas "clásicas", como por ejemplo la subtilisina 168, la subtilisina BPN', la subtilisina Carlsberg (ALCALASE®, Novozymes A/S) y la subtilisina DY.

- 60 [0074] Siezen et al. (supra) reconoce otro subgrupo de las subtilasas, I-S2. Las proteasas del subgrupo I-S2 se describen como subtilisinas altamente alcalinas y comprenden enzimas como por ejemplo la subtilisina PB92 (MAXACAL®, Gist-Brocades NV), la subtilisina 309 (SAVINASE®, Novozymes A/S), subtilisina 147 (ESPERASE®, Novozymes A/S), y la elastasa alcalina YaB.

- 65 [0075] Las mutaciones aleatorias y dirigidas al sitio del gen de subtilasa no solo surgieron del conocimiento de las propiedades físicas y químicas de la enzima, sino también contribuyeron con información acerca de la actividad catalítica de la subtilasa, de la especificidad del sustrato, de la estructura terciaria, etc. (Wells et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84; 1219-1223 ; Wells et al. (1986) Phil. Trans. R. Soc. Lond. A. 317 415-423 ; Hwang y Warshel

(1987) Biochem. 26 2669-2673 ; Rao et al., (1987) Nature 328 551-554.

[0076] Las publicaciones más recientes acerca de esta área son Carter et al. (1989) Proteins 6 240-248 que se refiere al diseño de variantes que escinden una secuencia diana específica en un sustrato (posiciones 24 y 64); Graycar et al. (1992) Annals of the New York Academy of Sciences 672 71-79 que trata sobre varios resultados publicados anteriormente; y Takagi (1993) Int. J. Biochem. 25 307-312 que también analiza los resultados anteriores.

[0077] Algunos ejemplos de proteasas disponibles comercialmente (peptidasas) incluyen Kannase™, Everlase™, Esperase™, Alcalase™, Neutrase™, Durazym™, Savinase™, Ovozyme™, Pyrase™, tripsina pancreática NOVO (PTN), Bio-Feed™ Pro y Clear-Lens™ Pro (todas disponibles en Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca). Otras proteasas preferidas incluyen las descritas en WO 01/58275 y en WO 01/58276.

[0078] Otras proteasas disponibles comercialmente incluyen Ronozyme™ Pro, Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Opticlean™, Propease™, Purafect™ y Purafect Ox™ (disponible en Genencor internacional Inc., Gist-Brocades, BASF, o DSM Nutritional Products).

[0079] Lipasas: las lipasas adecuadas incluyen aquellas cuyo origen es bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos.

[0080] Ejemplos de lipasas útiles incluyen una lipasa de Humicola lanuginosa, por ejemplo, como se describe en EP 258 068 y en EP 305 216, una lipasa de Rhizomucor miehei, por ejemplo, como se describe en EP 238 023, una lipasa de Candida, tal como una lipasa de C. antarctica, por ejemplo, la lipasa de C. antarctica A o B descrita en EP 214 761, una lipasa de Pseudomonas tal como una lipasa de P. pseudoalcaligenes y una lipasa de P. alcaligenes, por ejemplo, como se describe en EP 218 272, una lipasa de P. de cepacia, por ejemplo, como se describe en EP 331 376, una lipasa de P. stutzeri, por ejemplo, como se describe en BP 1,372,034, una lipasa de P. fluorescens, una lipasa de Bacillus, por ejemplo, una lipasa de B. subtilis (Dartois et al., (1993), Biochemica et Biophysica acta 1131,253-260), una lipasa de B. stearothermophilus (JP 64/744992) y una lipasa de B. pumilus (WO 91/16422).

[0081] Además, también pueden ser útiles varias lipasas clonadas, incluyendo la lipasa de Penicillium camembertii descrita por Yamaguchi et al., (1991), Gene 103,61-67, la lipasa de Geotricum candidum (Schimada, Y. et al., (1989), J. Biochem. 106,383-388), y varias lipasas de Rhizopus como por ejemplo una lipasa de R. delemar (Hass, M.J et al., (1991), Gene 109,117-113), una lipasa de R. niveus (Kugimiya et al., (1992), Biosci. Biotech. Biochem. 56,716-719) y una lipasa de R. oryzae.

[0082] También pueden ser útiles otros tipos de enzimas lipolíticas tal como las cutinasas, por ejemplo, una cutinasa que deriva de Pseudomonas mendocina como se describe en WO 88/09367, o una cutinasa que deriva de Fusarium solani pisi (descrita por ejemplo en WO 90/09446).

[0083] Algunos ejemplos de lipasas disponibles comercialmente incluyen Lipex™ Lipoprime™, Lipopan™, Lipolase™, Lipolase™ Ultra, Lipozyme™, Palatase™, Resinase™. Novozym™ 435 y Lecitase™ (todas disponible en Novozymes A/S).

[0084] Otras lipasas disponibles comercialmente incluyen Lumafast™ (lipasa de *Pseudomonas mendocina* de Genencor internacional Inc.); Lipomax™ (lipasa de *Ps. pseudoalcaligenes* de Gist-Brocades/Genencor Int. Inc.; y lipasa de *Bacillus sp.* de Solvay enzymes). Están disponibles otras lipasas de otros proveedores como por ejemplo Lipase P "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).

[0085] Amilasas: las amilasas adecuadas ( $\alpha$  y/o  $\beta$ ) incluyen aquellas cuyo origen es bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos. Las amilasas incluyen, por ejemplo,  $\alpha$ -amilasas que se obtienen de una cepa especial de B. licheniformis, que se describe más detalladamente en la descripción de la patente británica N.º 1,296,839. Las amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (disponibles en Novozymes A/S) y Rapidase™ y Maxamyl P™ (disponible en Gist-Brocades).

[0086] Celulasas: las celulasas adecuadas incluyen aquellas cuyo origen es bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos. Las celulasas adecuadas se divulgan en US 4,435,307, que divulga celulasas fúngicas producidas a partir de Humicola insolens. Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas que aportan beneficios en cuanto al cuidado del color. Algunos ejemplos de esas celulasas son las celulasas descritas en la solicitud de patente europea N.º 0 495 257.

[0087] Oxidorreductasas: Se puede usar en el presente documento cualquier oxidoreductasa adecuada para el uso en una composición líquida, por ejemplo, peroxidadas u oxidasas tal como las lacasas. Las peroxidadas adecuadas incluyen aquellas cuyo origen es vegetal, bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos. Algunos ejemplos de peroxidadas adecuadas son aquellas que derivan de una cepa de Coprinus, por ejemplo, C. Cinerius o C. macrorrhizus, o de una cepa de Bacillus, por ejemplo, B. Pumilus, específicamente la peroxidada según WO 91/05858. Las lacasas adecuadas incluyen aquellas cuyo origen es bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos. Algunos ejemplos de lacasas adecuadas son aquellas

que se pueden obtener a partir de una cepa de *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* o *T. versicolor*, o de una cepa de *Coprinus*, por ejemplo, *C. cinereus*, o de una cepa de *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*.

5 [0088] Los tipos de enzimas que pueden estar presentes en el líquido de la invención incluyen oxidorreductasas (EC 1.-.-), transferasas (EC 2.-.-), hidrolasas (EC 3.-.-), liasas (EC 4.-.-), isomerasas (EC 5.-.-) y ligasas (EC 6.-.-).

10 [0089] Las oxidorreductasas preferidas en el contexto de la invención son las peroxidasas (EC 1.11.1), lacasas (EC 1.10.3.2) y glucosa oxidasas (EC 1.1.3.4). Un ejemplo de una oxidorreductasa (EC 1.-.-) disponible comercialmente es Gluzyme (enzima disponible en Novozymes A/S). Están disponibles otras oxidorreductasas en otros proveedores. Las transferasas preferidas son transferasas que formen parte de cualquiera de las siguientes subclases:

- a transferasas que transfieren grupos monocarbonados (EC 2.1);
- b transferasas que transfieren residuos de aldehído o de cetona (EC 2.2); aciltransferasas (EC 2.3);
- c glicosiltransferasas (EC 2.4);
- 15 d transferasas que transfieren grupos alquilo o arilo, además de grupos metilo (EC 2.5); y
- e transferasas que transfieren grupos nitrogenados (EC 2.6).

20 [0090] El tipo más preferido de transferasas en el contexto de la invención es una transglutaminasa (proteína-glutamina-glutamilttransferasas; EC 2.3.2.13).

[0091] Se describen otros ejemplos de transglutaminasas adecuadas en WO 96/06931 (Novo Nordisk A/S).

25 [0092] Las hidrolasas preferidas en el contexto de la invención son: hidrolasas de éster carboxílico (EC 3.1.1.-) como por ejemplo lipasas (EC 3.1.1.3); fitasas (EC 3.1.3.-), por ejemplo 3-fitasas (EC 3.1.3.8) y 6-fitasas (EC 3.1.3.26); glicosidasas (EC 3.2, que forman parte de un grupo que se denomina en el presente documento "carbohidrasas"), como por ejemplo amilasas (EC 3.2.1.1); peptidasas (EC 3.4, que también se conocen como proteasas); y otras carbonil hidrolasas. Algunos ejemplos de fitasas disponibles comercialmente incluyen Bio-feed™ Phytase (Novozymes), Ronozyme™ P (DSM Nutritional Products), Natuphos™ (BASF), Finase™ (AB Enzymes), y la gama de productos Phyzyme™ (Danisco). Otras fitasas preferidas incluyen las que se describen en WO 98/28408, WO 00/43503 y WO 30 03/066847.

35 [0093] En el presente contexto, se utiliza el término "carbohidrasa" no solo para denotar enzimas capaces de descomponer cadenas de carbohidratos (por ejemplo almidones o celulosa) que poseen especialmente las estructuras de anillo con cinco y seis miembros (es decir glicosidasas, EC 3.2), sino también enzimas capaces de isomerizar carbohidratos, por ejemplo estructuras de anillo con seis miembros tal como la D-glucosa en estructuras de anillo con cinco miembros tal como D-fructosa.

[0094] Las carbohidrasas relevantes incluyen las siguientes ( los número EC están entre paréntesis):

40  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amilasas (EC 3.2.1.2), glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasas (EC 3.2.1.3), endo-1,4-beta-glucanasa (celulasas, EC 3.2.1.4), endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasas (EC 3.2.1.6), endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (EC 3.2.1.8), dextranasas (EC 3.2.1.11), quitinasas (EC 3.2.1.14), poligalacturonasas (EC 3.2.1.15), lisozimas (EC 3.2.1.17),  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21),  $\alpha$ -galactosidasas (EC 3.2.1.22),  $\beta$ -galactosidasas (EC 3.2.1.23), amilo-1,6-glucosidasas (EC 3.2.1.33), xilano 1,4- $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37), glucano endo-1,3- $\beta$ -D-glucosidasas (EC 3.2.1.39),  $\alpha$ -dextrina endo-1,6- $\alpha$ -glucosidasas (EC 3.2.1.41), sacarosa  $\alpha$ -glucosidasas (EC 3.2.1.48), glucano endo-1,3- $\alpha$ -glucosidasas (EC 3.2.1.59), glucano 1,4- $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.74), glucano endo-1,6- $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.75), galactanasas (EC 3.2.1.89), arabinano endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidasas (EC 3.2.1.99), lactasas (EC 3.2.1.108), quitosanasas (EC 45 3.2.1.132) y xilosa isomerasas (EC 5.3.1.5).

50 [0095] Algunos ejemplos de carbohidrasas disponibles comercialmente incluyen Alpha-Gal™, Bio-Feed™ Alpha, Bio-Feed™ Beta, Bio-Feed™ Plus, Bio-Feed™ Wheat, Bio-Feed™ Z, Novozyme™ 188, Carezyme™, Celluclast™, Cellusoft™, Celluzyme™, Ceremyl™, Citrozym™, Denimax™, Dezyme™, Dextrozyme™, Duramyl™, Energex™, Finizym™, Fungamyl™, Gamanase™, Glucanex™, Lactozym™, Liquezyme™, Maltogenase™, Natalase™, Pentopan™, Pectinex™, Promozyme™, Pulpzyme™, Novamyl™, Termamyl™, AMG™ (Amyloglucosidase Novo), Maltogenase™, Sweetzyme™ y Aquazym™ (todas disponible en Novozymes A/S). Están disponibles otras carbohidrasas en otros proveedores, como por ejemplo la gama de productos Roxazyme™ y Ronozyme™ (DSM Nutritional Products), la gama de productos Avizyme™, Porzyme™ y Grindazyme™ (Danisco, Finnfeeds) y Natugrain™ (BASF), Purastar™ y Purastar™ OxAm (Genencor).

60 [0096] Otras enzimas disponibles comercialmente incluyen Mannaway™, Pectaway™, Stainzyme™ y Renozyme™.

Detergentes líquidos

65 [0097] Según la invención la composición detergente líquida incluirá además de las enzima(s), del inhibidor y del potenciador del inhibidor uno o varios tensoactivos. La composición detergente puede, por ejemplo, ser una

composición detergente para ropa o una composición detergente lavavajillas.

5 [0098] El detergente contendrá normalmente 0 a 50% de tensioactivo aniónico como por ejemplo alquilbenceno sulfonato lineal (LAS), alfa-olefinsulfonato (AOS), sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso) (AS), alcohol etoxisulfato (AEOS o AES), alcanosulfonatos secundarios (SAS), alfa-sulfo metil ésteres de ácidos grasos, ácido alquil-succínico o ácido alquenil-succínico, o jabón. Puede contener además 0 a 40% de tensioactivo no iónico como por ejemplo alcohol etoxilado (AEO o AE), alcohol propoxilado, etoxilados de alcohol carboxilado, nonilfenol etoxilado, poliglucósido de alquilo, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, o polihidroxi alquil amida de ácido graso (como se describe por ejemplo en WO 92/06154).

10 [0099] Normalmente el detergente contiene 1 a 65% de un mejorador de detergente, sin embargo algunos detergentes lavavajillas pueden contener hasta 90% de un mejorador de detergente, o de un agente complejante como por ejemplo zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, citrato, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTMPA), ácido alquil-succínico o ácido alquenil-succínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (por ejemplo SKS-6 de Hoechst).

20 [0100] Se pueden subdividir los mejoradores de detergente en los tipos que contienen fósforo y en los tipos que no contienen fósforo. Algunos ejemplos de mejoradores de detergente alcalinos inorgánicos que contienen fósforo incluyen las sales hidrosolubles, especialmente pirofosfatos de metales alcalinos, ortofosfatos, polifosfatos y fosfonatos. Algunos ejemplos de mejoradores inorgánicos que no contienen fósforo incluyen carbonatos hidrosolubles de metales alcalinos, boratos y silicatos y también disilicatos estratificados y los varios tipos de aminosilicatos insolubles en agua cristalinos o amorfos de los cuales los zeolitas son el representante más conocido.

25 [0101] Algunos ejemplos no limitativos de mejoradores orgánicos adecuados incluyen metal alcalino, amonio o sales de amonio sustituidos de succinatos, malonatos, malonatos de ácido graso, sulfonatos de ácido graso, carboximetoxi succinatos, poliactatos, carboxilatos, policarboxilatos, aminopolicarboxilatos y carboxilatos de poliacteto. El detergente también puede ser no mejorado, es decir no contiene esencialmente ningún mejorador de detergente.

30 [0102] El detergente puede comprender o incluir uno o varios polímeros. Los ejemplos no limitativos son carboximetilcelulosa (CMC); poli(vinilpirrolidona) (PVP), polietilenglicol (PEG), alcohol (poli)vinílico (PVA), policarboxilatos como por ejemplo poliacrilatos, polimaleatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de ácido acrílico/lauril metacrilato.

35 [0103] La composición detergente puede contener agentes blanqueadores del tipo cloro/bromo o del tipo oxígeno. Se pueden revestir o encapsular los agentes blanqueadores. Algunos ejemplos de blanqueadores inorgánicos del tipo cloro/bromo son litio, hipoclorito o hipobromito de calcio o de sodio y también fosfato de trisodio clorurado. El sistema de blanqueo también puede comprender una fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como por ejemplo perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador de blanqueo que forma perácido como por ejemplo tetraacetiletildiamina (TAED) o nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS).

40 [0104] Algunos ejemplos de blanqueadores orgánicos del tipo cloro/bromo son N-bromoimidaz y N-cloroimidaz heterocíclicas como por ejemplo, ácidos tricloroisocianúrico, tribromoisocianúrico, dibromoisocianúrico y dicloroisocianúrico y sales de los mismos con cationes que solubilizan en el agua como por ejemplo potasio y sodio. Los compuestos de hidantoína también son adecuados. El sistema de blanqueo también puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, del tipo amida, imida o sulfona.

50 [0105] En los detergentes lavavajillas se prefieren los blanqueadores de oxígeno, por ejemplo en forma de una persal inorgánica, preferiblemente con un precursor de blanqueador o como un compuesto de peroxiácido. Algunos ejemplos típicos de compuestos blanqueadores peroxi adecuados son perboratos de metal alcalino, tanto tetrahidratos como monohidratos, percarbonatos, persilicatos y perfosfatos de metal alcalino. Los materiales activadores preferidos son TAED o NOBS.

55 [0106] La(s) enzima(s) de la composición detergente de la invención pueden adicionalmente ser estabilizadas utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar o ácido láctico.

60 [0107] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergente convencionales, como por ejemplo, suavizantes textiles que incluyen arcillas, material defloculante, potenciadores de espuma/depresores de espuma (en los detergentes lavavajillas se usan depresores de espuma), supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes suspensores de suciedad, agentes anti-redeposición de suciedad, colorantes, agentes de deshidratación, bactericidas, abrillantadores ópticos, o perfume.

65 [0108] El pH (medido en la solución acuosa a la concentración de uso) será normalmente neutro o alcalino, por ejemplo en la gama de 7 a 11. En una forma de realización específica de la presente invención el pH está entre 7 y 9,5. En una forma de realización más específica de la presente invención el pH está entre 8 y 9. Se descubrió que para determinados detergentes la invención funciona particularmente bien si el pH del detergente está entre 8 y 9.

[0109] Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran adicionalmente composiciones, métodos, y tratamientos de acuerdo con la presente divulgación. Debe señalarse que la divulgación no se limita a los detalles específicos representados en los ejemplos.

5 **Ejemplos**

**Ejemplo 1**

Ensayo de estabilidad de almacenamiento

10

Base del detergente:

[0110]

15

55 g de agente tensoactivo aniónico Na-LAS  
 105 g de agente tensoactivo aniónico Surfac LC70  
 25 g de agente tensoactivo no iónico Neodol 25-3  
 30 g de agente tensoactivo no iónico Neodol 25-7  
 40 g de NaCO<sub>3</sub>

20

33 g de SXS (solución de xilenosulfonato de sodio 40% en peso en agua)  
 17 g de monohidrato de citrato  
 10 g de STS (sulfonato de tolueno de sodio)  
 10 g de etanol  
 PH ajustado para pH 9 (NaOH)

25

Agua hasta 1000g  
 PH 9

[0111] Se diluyó la base del detergente en 1:1,5 agua.

30

[0112] La cantidad de sal que se añadió era 3% de sal en peso con base en la base del detergente diluida.

[0113] Se añadió la proteasa en una cantidad de 0,173 KNPU-S/g, actividad específica de 395 u/g. Se añadió 4-FPBA en cantidades de 0,17 mg/g de base de detergente diluida base + sal.

35

[0114] Las condiciones de almacenamiento que se seleccionaron fueron cuatro semanas de almacenamiento a 40°C.

Sal examinada	Actividad Residual (4 semanas a 40°C)	Catión	Anión		
Cloruro de magnesio	79%	Mg	Cl	Referencia	
Nitrato de magnesio	55%	Mg	NO <sub>3</sub>		
Cloruro de armonio	49%	NH <sub>4</sub>	Cl		
Sulfato de armonio	43%	NH <sub>4</sub>	SO <sub>4</sub>		
Nitrato de armonio	41%	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>		
Sulfato de magnesio	37%	Mg	SO <sub>4</sub>		
Cloruro de potasio	34%	K	Cl		
Cloruro de sodio	32%	Na	Cl		
Formiato de sodio	29%	Na	CHO <sub>2</sub>		
Cloruro de calcio	22%	Ca	Cl		
Sulfato de sodio	22%	Na	SO <sub>4</sub>		
Nitrato de sodio	20%	Na	NO <sub>3</sub>		
Acetato de sodio	20%	Na	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		
Cloruro de aluminio	16%	Al	Cl		
Carbonato de sodio	15%	Na	CO <sub>3</sub>	Referencia	
Fosfato de sodio	13%	Na	PO <sub>4</sub>		Referencia
Ninguna sal	6%	...	...		Referencia
Citrato de sodio	1%	Na	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Referencia	

40

[0115] Se puede concluir que la mayor parte de las sales tienen una influencia positiva en la estabilidad de la base del detergente que comprende un derivado de ácido fenil borónico. Los cationes más prometedores parecen ser magnesio y armonio.

**Ejemplo 2**

Ensayo de estabilidad de almacenamiento

45

[0116] Base del detergente:

- 55 g de agente tensoactivo aniónico Na-LAS
- 105 g de agente tensoactivo aniónico Surfac LC70
- 5 25 g de agente tensoactivo no iónico Neodol 25-3
- 30 g de agente tensoactivo no iónico Neodol 25-7
- 40 g de NaCO<sub>3</sub>
- 33 g de SXS (solución de xilenosulfonato de sodio 40% en peso en agua)
- 17 g de monohidrato de citrato
- 10 10 g de STS (sulfonato de tolueno de sodio)
- 10 g de etanol
- PH ajustado para pH 9 (NaOH)
- Agua hasta 1000g

15 [0117] Se diluyó la base del detergente en 1:1,5 agua.

[0118] La cantidad de sal que se añadió era 3% de sal en peso con base en el detergente.

20 [0119] Se añadió la proteasa en una cantidad de 0,173 KNPU-S/g, actividad específica de 395 u/g. Se añadió 4-FPBA en cantidades de 0,17 mg/g de detergente + sal.

[0120] Las condiciones de almacenamiento que se seleccionaron fueron dos semanas de almacenamiento a 40°C.

Sal examinada	Actividad Residual (2 semanas a 40°C)	Catión	Anión	
Cloruro de cinc	102%	Zn	Cl	Referencia
Sulfato de cinc	88%	Zn	SO <sub>4</sub>	
Ninguna sal	33%	...	...	

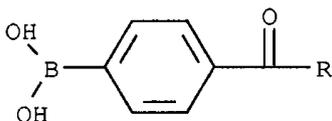
25 [0121] Ambas sales de cinc presentan una mejora significativa en la estabilidad.

[0122] Se entenderá que se pueden llevar a cabo varias modificaciones a las formas de realización descritas en el presente documento. Por lo tanto, la descripción anterior no debe ser interpretada como limitante, sino meramente como ejemplificaciones de formas de realización.

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición líquida que comprende un constituyente enzimático, un constituyente de ácido fenil borónico o un derivado del mismo, y un constituyente de sal disuelto en la cual el constituyente de sal comprende un anión que es cloruro, sulfato, nitrato o acetato, y el constituyente de sal está presente en una cantidad de 0,5 a 10 % en peso de la composición total.
- 10 2. Composición líquida de la reivindicación 1, en la cual el constituyente enzimático es una proteasa.
3. Composición líquida de la reivindicación 2, en la cual la proteasa es una serina proteasa.
4. Composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el ácido fenil borónico o el derivado del mismo es



- 15 en el cual R es seleccionado del grupo que está compuesto por hidrógeno, hidroxilo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo sustituido, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquenilo y C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquenilo sustituido.
- 20 5. Composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el constituyente de sal comprende uno o más cationes, en la que el uno o más cationes comprenden Ca, Mg, Zn, Na, K o NH<sub>4</sub> y combinaciones de los mismos.
- 25 6. Composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el constituyente de sal comprende uno o varios cationes seleccionados del grupo que está compuesto por Ca, Mg, Zn, Na, K, NH<sub>4</sub> y combinaciones de los mismos.
7. Composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el constituyente de sal comprende uno o varios cationes seleccionados del grupo que está compuesto por Zn, Mg, NH<sub>4</sub> y combinaciones de los mismos.
- 30 8. Proceso para la fabricación de la composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye las fases de:
- 35 a) proporcionar un líquido;  
 b) añadir la sal hidrosoluble al líquido de a);  
 c) añadir a a) una enzima y un ácido fenil borónico o un derivado del mismo, simultáneamente con b) o tras añadirlos a b); y  
 d) mezclar la composición líquida.
- 40 9. Uso de la composición de las reivindicaciones 1 a 7, para limpiar un objeto.
10. Uso de una sal para potenciar el efecto inhibitor de un ácido fenil borónico o un derivado del mismo en una composición enzimática líquida en la cual la sal comprende un anión que es cloruro, sulfato, nitrato o acetato y la sal está presente en una cantidad de 0,5 a 10 % en peso de la composición total.