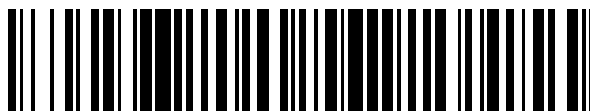


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 208**

51 Int. Cl.:

**C11D 3/386** (2006.01)

**C12N 9/54** (2006.01)

**C11D 3/37** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2011** **E 11714904 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015** **EP 2558560**

54 Título: **Composición detergente para lavavajillas**

30 Prioridad:

**20.09.2010 US 384487 P**

**15.04.2010 US 324472 P**

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

**11.02.2016**

73 Titular/es:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.0%)**  
**One Procter & Gamble Plaza**  
**Cincinnati, OH 45202, US**

72 Inventor/es:

**SOUTER, PHILLIP FRANK;**  
**WARD, GLENN STEVEN;**  
**GOEDEGEBUUR, FRITS;**  
**POULOSE, AYROOKARAN JOSEPH;**  
**ESTELL, DAVID A.;**  
**BOTT, RICHARD R. y**  
**CASCÃO-PEREIRA, LUIS GUSTAVO**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

### Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 559 208 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**

Composición detergente para lavavajillas

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de las composiciones detergentes para lavavajillas y a métodos de preparación y uso de los mismos. En particular, se refiere a una composición detergente para lavavajillas que comprende una proteasa nueva. La composición proporciona una mejor limpieza y acabado.

10 **Antecedentes de la invención**

El formulador de detergente para lavavajillas está constantemente buscando formulaciones mejoradas y más rentables. USPA 2009/0233831 A1 describe una composición detergente para lavavajillas que comprende una combinación de una proteasa mejorada y una amilasa de baja temperatura. Sin embargo, son necesarias composiciones mejores.

WO2010123754 representa una técnica anterior conforme a lo dispuesto en el artículo 54(3) EPC y se refiere a métodos y a composiciones para la producción de proteasas maduras en huéspedes bacterianos. Una de las proteasas producidas consiste en SEQ ID N.º:1 de la presente aplicación con las mutaciones N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A + S182D + V238R.

Es deseable una limpieza mejorada, especialmente de manchas de origen proteico como, por ejemplo, manchas de huevo, así como el brillo de la vajilla, cubertería y cristalería, por ejemplo, de los platos, tazas, cacerolas y tenedores. El fosfato puede actuar captando humedad, protegiendo de ese modo otros ingredientes sensibles a la humedad, tales como los enzimas contenidos en el detergente y contribuir por lo tanto a las propiedades deseadas anteriormente mejoradas. En años recientes la tendencia ha sido hacia la eliminación del fosfato de los detergentes. Dicha eliminación tiene un impacto negativo en la capacidad limpiadora del detergente y a su estabilidad de almacenamiento. Por lo tanto, el reto actual es mantener/mejorar la estabilidad del detergente y la capacidad limpiadora/brillo, especialmente cuando el detergente está exento de fosfato.

Los solicitantes describen una composición detergente para lavavajillas que comprende una proteasa nueva. Dicha composición satisface el reto anteriormente mencionado. En un aspecto, la composición detergente para lavavajillas comprende una proteasa mejorada y una amilasa y, de forma opcional, una lipasa. Las composiciones detergentes para lavavajillas de la invención previenen la formación de sedimento arenoso en la superficie de los artículos lavados, que es uno de los problemas habituales del lavado en lavavajillas. La composición detergente para lavavajillas proporciona excelentes resultados de limpieza y acabado incluso a bajas temperaturas y es respetuosa con el medio ambiente en términos de energía y de reducción del uso de materias primas.

40 **Sumario de la invención**

La presente invención pertenece al campo de las composiciones detergentes para lavavajillas y a métodos de preparación y uso de los mismos. En particular, se refiere a una composición detergente para lavavajillas que comprende una proteasa nueva. La composición proporciona una mejor limpieza y acabado. En particular, la composición detergente para lavavajillas de la invención proporciona una mejor retirada proteica al mismo nivel que otras proteasas presentes en el mercado. Esto permite también de forma alternativa el uso de un menor nivel de la proteasa de la invención y, por lo tanto, obtener una composición más rentable.

La invención proporciona una composición detergente para lavavajillas que comprende una proteasa variante de una proteasa precursora, siendo la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa precursora idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º:1, consistiendo dicha variante de proteasa de dichas mutaciones de proteasa precursora en una de las siguientes series de mutaciones con respecto a dicha proteasa precursora:

(i) N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A;

(ii) N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A + S182D + V238R; y un aditivo reforzante de la detergencia.

La invención también proporciona un elemento de dosificación de detergente para lavavajillas para usar en un dispositivo autosifificador, comprendiendo el elemento de dosificación una composición según la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de lavado de vajillas en un lavavajillas utilizando una composición detergente para lavavajillas según la invención, que comprende la etapa de colocar la composición detergente para lavavajillas en un dispensador de producto o en un dispositivo dispensador autosifificador y liberarlo durante el ciclo de lavado principal.

## Breve descripción de las figuras

La Figura 1 presenta una alineación de la secuencia de aminoácidos madura de subtilisina GG36 de *B. lentus*, la secuencia de aminoácidos madura de la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens*, y secuencias de aminoácidos de polipéptidos de variante de proteasa ilustrativos de la invención designados por PX4 y PX5, respectivamente.

La Figura 2 proporciona un mapa de plásmido del plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36.

## Descripción detallada de la invención

### Terminología relacionada con las enzimas

#### *Nomenclatura de las modificaciones en los aminoácidos*

Para facilitar la referencia, se va a utilizar en la presente memoria la siguiente nomenclatura para describir las variantes enzimáticas: Aminoácido(s) original(es):posición (posiciones) del (de los) aminoácido(s) sustituido(s).

Según esta nomenclatura, por ejemplo, la sustitución de ácido glutámico por glicina en la posición 195 se muestra como G195E. Una delección de glicina en la misma posición se muestra como G195\*, y la inserción de un residuo de aminoácido adicional como la lisina se muestra como G195GK. Cuando una enzima específica contiene una "delección" en comparación con otra enzima y se realiza una inserción en dicha posición, esto se indica como \*36D para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36. Las múltiples mutaciones están separadas por signos de adición, es decir: S99G+V102N, representando mutaciones en las posiciones 99 y 102 que sustituyen serina y valina por glicina y asparagina, respectivamente. Cuando el aminoácido en una posición (*por ejemplo*, 102) pueda substituirse por otro aminoácido seleccionado de un grupo de aminoácidos, por ejemplo, el grupo que consiste en N e I, esto se indicará mediante V102N/I.

En todos los casos, se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o en triplete aceptada por la IUPAC.

### Numeración de los aminoácidos de la proteasa

La numeración utilizada en esta patente es el sistema de numeración BPN' utilizado habitualmente en la técnica. Un esquema de numeración alternativo es numerando la secuencia de aminoácidos específica de la proteasa (GG36) indicada como SEQ ID N.º:1. Por comodidad de uso, a continuación se comparan en la Tabla 1 los dos esquemas de numeración diferentes de dos variantes de proteasas para usar en composiciones detergentes para lavavajillas de la invención

*Tabla 1 – Numeración de las mutaciones de proteasa*

| numeración GG36 (numeración referida a la SEC ID N.º 1)     | Numeración BPN' equivalente de esta patente                 |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A                 | N76D + S87R + G118R + S128L + P129Q + S130A                 |
| N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A + S182D + V238R | N76D + S87R + G118R + S128L + P129Q + S130A + S188D + V244R |

La Figura 1 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos madura la subtilisina GG36 de de *B. lentus*, la secuencia de aminoácidos madura de la subtilisina de BPN' *B. amyloliquefaciens*, y secuencias de aminoácidos de polipéptidos de variante de proteasa ilustrativos de la invención designados por PX4 y PX5, respectivamente.

### Identidad de aminoácido

El grado de relación entre dos secuencias de aminoácidos se describe con el parámetro "identidad". Para los fines de la presente invención, la alineación de dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el programa Needle del paquete informático EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineación global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443 -453. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización por apertura de huecos es 10, y la penalización por extensión de huecos es 0,5.

El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de una enzima usada en la presente memoria ("secuencia de la invención") y una secuencia de aminoácidos diferente ("secuencia extraña") se calcula como el número de emparejamientos exactos en una alineación de ambas secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención", o la longitud de la "secuencia extraña", lo que sea más corto. El resultado se expresa como porcentaje de identidad. El emparejamiento exacto se produce cuando la "secuencia de la invención" y la "secuencia extraña" tienen residuos de aminoácidos idénticos situados en las mismas posiciones del solapamiento. La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia.

Los términos “compuesto basado en succinato” y “compuesto basado en ácido succínico” son intercambiables en la presente memoria.

- 5 En la presente memoria, los artículos tales como “un” y “una” cuando se usan en una reivindicación, se refieren a uno o más de aquello que se reivindica o que se describe.

Según se usa en la presente memoria, las expresiones “incluyen”, “incluye” e “incluidos” deben entenderse como no limitativas.

- 10 Salvo que se indique lo contrario, todos los niveles del componente o de la composición se refieren a una parte activa de ese componente o composición, y son excluyentes de impurezas, por ejemplo, disolventes residuales o subproductos, que puedan estar presentes en las fuentes comerciales de dichos componentes o composiciones.

- 15 Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso salvo que se indique lo contrario. Todos los porcentajes y relaciones se calculan basados en la composición total salvo que se indique lo contrario.

- Debe entenderse que cada limitación numérica máxima proporcionada a lo largo de esta memoria descriptiva incluye cada limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresamente escritas en la presente memoria. Cada limitación numérica mínima proporcionada a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá cada limitación numérica superior, como si dichas limitaciones numéricas superiores estuvieran expresamente escritas en la presente memoria. Cada intervalo numérico proporcionado a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más limitado que se encuentra dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si todos los citados intervalos numéricos más limitados estuviesen expresamente escritos en la presente memoria.

- 25 Composiciones detergentes para lavavajillas

- En un aspecto, la invención proporciona una composición detergente para lavavajillas que comprende una variante de proteasa de una proteasa precursora, siendo dicha secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:1, consistiendo dicha variante de proteasa de dichas mutaciones de proteasa precursora en una de las siguientes series de mutaciones con respecto a dicha proteasa precursora:

(i) N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A;

- 35 (ii) N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A + S182D + V238R;

y un aditivo reforzante de la detergencia.

- En un aspecto, dicha composición detergente para lavavajillas puede comprender un agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato o de tipo no fosfato y en donde el agente reforzante de la detergencia de tipo no fosfato se selecciona de MGDA (ácido metil-glicindiacético); GLDA (ácido glutámico-N,N-diacético), IDS (ácido iminodisuccínico), sales de carboximetilululina y derivados de los mismos y una mezcla de los mismos.

- En un aspecto, dicha composición detergente para lavavajillas puede comprender un polímero sulfonado.

- En un aspecto, dicha composición detergente para lavavajillas puede comprender un coadyuvante de secado.

En un aspecto, dicha composición detergente para lavavajillas puede comprender una enzima amilasa.

- En un aspecto, dicha composición detergente para lavavajillas puede comprender una enzima celulasa.

En un aspecto, en dicha composición detergente para lavavajillas el nivel de proteasa es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 4,5 mg, o de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 4 mg de proteasa activa por gramo de composición.

- Descripción detallada de materiales adicionales para usar en la composición detergente para lavavajillas

#### Proteasas adicionales

- En la composición detergente para lavavajillas de la invención puede usarse una mezcla de dos o más proteasas. Una mezcla de proteasas puede contribuir a una mejor limpieza en un intervalo más amplio de temperatura y/o de sustrato y proporcionar ventajas de brillo superiores, especialmente cuando se usan junto con un polímero sulfonado.

- Las proteasas adecuadas para usar en combinación con la variante de proteasa utilizada en la invención incluyen metaloproteasas y serina proteasas, incluyendo serina proteasas neutras o alcalinas, tales como subtilisinas (EC 3.4.21.62). Las proteasas adecuadas incluyen las de procedencia animal, vegetal o microbiana. Se prefiere las de

origen microbiano. Se incluyen las mutantes modificadas química o genéticamente. La proteasa puede ser una serina proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una quimiotripsina o una proteasa de tipo tripsina. Los ejemplos de proteasas neutras o alcalinas incluyen:

(a) subtilisinas (EC 3.4.21.62), especialmente las derivadas de *Bacillus*, tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en US-6.312.936 B1, US-5.679.630, US-4.760.025 y USPA 2009/0170745A1.

(b) proteasas del tipo tripsina o quimiotripsina, tales como tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino), la proteasa de *Fusarium* descrita en USP 5.288.627 y las proteasas de quimiotripsina derivadas de *Cellulomonas* descritas en USPA 2008/0063774A1.

(c) metaloproteasas, especialmente las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* descritas en USPA 2009/0263882A1 y USPA 2008/0293610A1.

Las enzimas proteasas adecuadas comerciales incluyen las que se venden con los nombres comerciales Alcalase®, Savinase®, Primase®, Durazym®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase®, Ovozyme®, Neutrase®, Everlase® y Esperase® por Novozymes A/S (Dinamarca), las que se venden con el nombre comercial Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Properase®, Purafect®, Purafect Prime®, Purafect Ox®, FN3®, FN4®, Excellase® y Purafect OXP® por Genencor International (ahora Danisco US Inc.), las que se venden con el nombre comercial Opticlean® y Optimase® por Solvay Enzymes, las comercializadas por Henkel/ Kemira, especialmente BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 de US-5.352.604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, denominada a continuación como BLAP), BLAP R (BLAP con S3T + V4I + V199M + V205I + L217D), BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I) y BLAP F49 (BLAP con S3T + V4I + A194P + V199M + V205I + L217D) - todas de Henkel/Kemira; y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus* con mutaciones en A230V + S256G + S259N) de Kao.

En un aspecto, se emplean proteasas comerciales seleccionadas del grupo que consiste en Properase®, Purafect®, Ovozyme®, Everlase®, Savinase®, Excellase® y FN3®.

#### Amilasas

Las enzimas amilasa son enzimas adicionales que son útiles en la composición detergente para lavavajillas de los solicitantes. Las amilasas adecuadas incluyen las descritas en USPA 2009/0233831 A1 y USPA 2009/0314286A1. Las amilasas comerciales adecuadas para su uso en la presente invención incluyen STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA® y NATALASE® (Novozymes A/S) y Spezyme Xtra™ y Powerase™. STAINZYME PLUS® y Powerase™ pueden ser especialmente útiles.

#### Celulasas

En un aspecto, la composición detergente para lavavajillas de la invención comprende una enzima celulasa. La composición proporciona excelentes resultados en términos no solo de limpieza de la vajilla, cubertería y cristalería, sino también en términos de limpieza del lavavajillas.

Las enzimas celulasa incluyen endoglucanasas derivadas de microorganismos con actividad endo-beta-1,4-glucanasa (E.C. 3.2.1.4), incluyendo un polipéptido bacteriano endógeno para un miembro del género *Bacillus* que tiene una secuencia con una identidad de al menos 90%, 94%, 97% e incluso del 99% con la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º 2 en US-7.141.403B2 y mezclas de los mismos. Las celulasas comerciales adecuadas para su uso en la presente invención incluyen Celluzyme®, Celluclean®, Whitezyme® (Novozymes A/S) y Puradax HA® (Genencor International, ahora Danisco US Inc.).

#### Otras enzimas adicionales

Otras enzimas adicionales adecuadas para usar en la composición para lavavajillas de la invención pueden comprender una o más enzimas seleccionadas del grupo que comprende hemicelulasas, celobiosa dehidrogenasas, peroxidases, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas, pectinasas, mananasas, pectato liasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tanninas, pentosanasas, malanasas, β-glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa, y mezclas de las mismas.

En un aspecto, dicha enzima adicional puede ser seleccionada del grupo que consiste en lipasas, incluidas "lipasas del primer ciclo" que comprenden una sustitución de un aminoácido con carga eléctrica neutra o negativa con R o K en cualquiera de las posiciones 3, 224, 229, 231 y 233 en el tipo natural de *Humicola Lanuginosa*, cuya secuencia se muestra como SEC ID N.º 1 en las páginas 5 y 6 de la patente US-6.939.702 B1, en un aspecto, una variante que comprende las mutaciones T231R y N233R. Una de dichas variantes se comercializa con el nombre comercial Lipex® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).

Componentes estabilizadores de la enzima: los estabilizadores de enzima adecuados incluyen oligosacáridos, polisacáridos y sales metálicas inorgánicas divalentes, tales como sales de metales alcalinotérreos, especialmente sales de calcio. Los cloruros y los sulfatos son pueden ser especialmente adecuados con el cloruro de calcio, siendo en un aspecto especialmente adecuada una sal de calcio. Se pueden encontrar ejemplos de oligosacáridos y polisacáridos adecuados, tales como dextrinas, en USPA 2008/0004201 A1. En el caso de composiciones acuosas que comprenden proteasas, se puede agregar un inhibidor de la proteasa reversible, tal como un compuesto de boro, incluyendo borato y ácido 4-formil fenil borónico, o un aldehído tripéptido, para mejorar adicionalmente la estabilidad.

#### Sustancias activas limpiadoras

Se puede usar cualquier ingrediente limpiador además de aditivos reforzantes de la detergencia como parte del producto detergente para lavavajillas de la invención. Los niveles dados son en porcentaje en peso, y se refieren a la composición total (excluyendo el material soluble en agua del envoltorio, en el caso de formas en dosis unitaria que tienen un envoltorio o material de envuelta). La composición detergente para lavavajillas puede contener un agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato o estar exento de agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato y comprender uno o más componentes detergentes activos que se pueden seleccionar entre blanqueador, activador del blanqueador, catalizador del blanqueador, tensioactivos, fuentes de alcalinidad, polímero sulfonado, coadyuvantes de tinción, agentes anticorrosión (p. ej. silicato sódico) y agentes de cuidado. Los componentes limpiadores especialmente adecuados para su uso en la presente memoria incluyen un compuesto aditivo reforzante de la detergencia, un blanqueador, una fuente de alcalinidad, un tensioactivo, polímero anti-incrustaciones, por ejemplo un polímero sulfonado, una enzima y un agente blanqueante adicional.

#### Tensioactivo

Los tensioactivos adecuados para su uso en la presente invención incluyen tensioactivos no iónicos. Tradicionalmente, los tensioactivos no iónicos se han utilizado en composiciones detergentes para lavavajillas con fines de modificación de superficie, en particular para el descolgamiento para evitar la formación de películas y cercos, y para mejorar el brillo. Se ha descubierto que los tensioactivos no iónicos pueden también ayudar a evitar la redeposición de la suciedad.

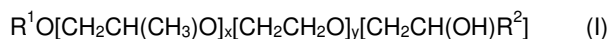
En un aspecto, el producto detergente para lavavajillas de la invención comprende es un tensioactivo no iónico o un sistema tensioactivo no iónico, en un aspecto, el tensioactivo no iónico o el sistema tensioactivo no iónico tiene una temperatura de inversión de fase, medida a una concentración de 1% en agua destilada, entre 40 °C y 70 °C, preferiblemente entre 45 °C y 65 °C. Un "sistema tensioactivo no iónico" significa una mezcla de dos o más tensioactivos no iónicos. Los sistemas tensioactivos no iónicos son especialmente útiles puesto que parecen presentan propiedades de limpieza y acabado mejoradas, y una mejor estabilidad en el producto que los tensioactivos no iónicos individuales.

La temperatura de inversión de fase es la temperatura por debajo de la cual un tensioactivo, o una mezcla de los mismos, se reparte preferiblemente en la fase acuosa como micelas hinchadas de aceite, y por encima de la cual se reparte preferentemente en la fase oleosa como micelas inversas hinchadas de agua. La temperatura de inversión de fase se puede determinar visualmente identificando la temperatura a la que aparece la turbidez.

La temperatura de inversión de fase de un tensioactivo o sistema no iónico puede determinarse del siguiente modo: se prepara una solución que contiene 1% del tensioactivo o mezcla correspondiente en peso de la solución en agua destilada. La solución se agita suavemente antes del análisis de la temperatura de inversión de fase para garantizar que el proceso se lleva a cabo en equilibrio químico. La temperatura de inversión de fase se toma en un baño termostático sumergiendo las soluciones en tubos de ensayo de vidrio precintados de 75 mm. Para garantizar la ausencia de escapes, el tubo de ensayo se pesa antes y después de la medida de la temperatura de inversión de fase. La temperatura aumenta gradualmente a una velocidad inferior a 1 °C por minuto, hasta que la temperatura alcanza unos pocos grados por debajo de la temperatura de inversión de fase previamente estimada. La temperatura de inversión de fase se determina visualmente en el primer indicio de turbidez.

Tensioactivos no iónicos adecuados incluyen: i) tensioactivos no iónicos etoxilados preparados por reacción de un monohidroxialcohol o alquilfenol de 6 a 20 átomos de carbono, de forma típica con al menos 12 moles, al menos 16 moles, o incluso al menos 20 moles de óxido de etileno por mol de alcohol o alquilfenol; ii) tensioactivos alcoxilados de alcohol que tienen de 6 a 20 átomos de carbono y al menos un grupo etoxi y propoxi. En un aspecto, son especialmente útiles mezclas de tensioactivos i) y ii).

Otra clase de tensioactivos no iónicos adecuados son los polialcoholes oxialquilados terminalmente protegidos con grupos epoxi representados por la fórmula:

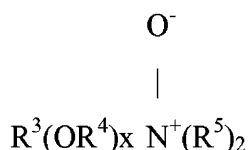


en donde  $R^1$  es un radical hidrocarburo alifático, lineal o ramificado, que tiene de 4 a 18 átomos de carbono;  $R^2$  es un radical hidrocarburo alifático lineal o ramificado que tiene de 2 a 26 átomos de carbono; x es un número entero con un valor medio de 0,5 a 1,5, o es aproximadamente 1, e y es un número entero que tiene un valor de al menos 15, o al menos 20.

En un aspecto, el tensioactivo de fórmula I, tiene al menos aproximadamente 10 átomos de carbono en la unidad epóxido terminal  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{R}_2]$ . Los tensioactivos de fórmula I adecuados, según la presente invención, incluyen los tensioactivos no iónicos poli-TERGENT® SLF-18B de Olin Corporation, como los descritos, por ejemplo, en USP 5.766.371 y en USP 5.576.281.

Los tensioactivos no iónicos y/o sistema no iónico adecuados para usar como agentes antirredeposición en la presente memoria pueden tener un tiempo de humectación de Draves inferior a 360 segundos, inferior a 200 segundos, inferior a 100 segundos, o inferior a 60 segundos, medido mediante el método de humectación de Draves (método estándar ISO 8022 utilizando las siguientes condiciones; un tejido de 3 g gancho, 5 g de algodón, al 0,1% en peso en solución acuosa a una temperatura de 25 °C).

Los tensioactivos de tipo óxido de amina también son útiles en la presente invención como tensioactivos antirredeposición e incluyen compuestos lineales y ramificados que tienen la fórmula:



en donde  $\text{R}^3$  se selecciona de un grupo alquilo, hidroxialquilo, acilamidopropilo y alquilfenilo, o mezclas de los mismos, que contiene de 8 a 26 átomos de carbono, o de 8 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^4$  es un grupo alquilenos o hidroxialquilenos que contiene de 2 a 3 átomos de carbono, o 2 átomos de carbono, o mezclas de los mismos; x es de 0 a 5, o de 0 a 3; y cada  $\text{R}^5$  es un grupo alquilo o hidroxialquilo que contiene de 1 a 3, preferiblemente de 1 a 2 átomos de carbono, o un grupo de poli(óxido de etileno) que contiene de 1 a 3, o incluso 1 grupo de óxido de etileno. Los grupos  $\text{R}^5$  pueden estar unidos entre sí, por ejemplo mediante un átomo de oxígeno o de nitrógeno, para formar una estructura de anillo.

Estos tensioactivos de tipo óxido de amina incluyen en particular óxidos de alquil  $\text{C}_{10}\text{-C}_{18}$  dimetilamina y óxidos de alcoxi  $\text{C}_8\text{-C}_{18}$  etil dihidroxietilamina. Ejemplos de estos materiales incluyen el óxido de dimetiloctilamina, el óxido de dietildecilamina, el óxido de bis-(2-hidroxietil)dodecilamina, el óxido de dimetildodecilamina, el óxido de dipropiltetradecilamina, el óxido de metiletilhexadecilamina, el óxido de dodecilamidopropil dimetilamina, el óxido de cetil dimetilamina, el óxido de estearil dimetilamina, el óxido de sebo-dimetilamina y el óxido de dimetil-2-hidroxiocetadecilamina. En un aspecto, se emplean óxido de alquildimetilamina  $\text{C}_{10}\text{-C}_{18}$  y óxido de acilamido-( $\text{C}_{10}\text{-C}_{18}$ ) alquildimetilamina.

Los tensioactivos pueden estar presentes en cantidades de 0% a 10% en peso, de 0,1% a 10%, e incluso de 0,25% a 6% en peso de la composición total.

#### Aditivo reforzante de la detergencia

Los aditivos reforzantes de la detergencia para su uso en la presente invención incluyen agentes reforzantes de la detergencia con fosfato o agentes reforzantes de la detergencia sin fosfatos. Si están presentes, los aditivos reforzantes de la detergencia se usan a un nivel de 5% a 60%, de 10% a 50%, o incluso de 10% a 50% en peso de la composición detergente para lavavajillas. En algunas realizaciones, el producto detergente para lavavajillas comprende una mezcla de agentes reforzantes de la detergencia de tipo fosfato y de tipo no fosfato.

#### Agentes reforzantes de la detergencia de tipo fosfato

Se utilizan agentes reforzantes de la detergencia de tipo fosfato preferidos que incluyen monofosfatos, difosfatos, tripolifosfatos o polifosfatos oligoméricos. Se prefieren las sales de metal alcalino de dichos compuestos, en particular las sales de sodio. Un agente reforzante de la detergencia especialmente preferido es el tripolifosfato de sodio (STPP).

#### Agentes reforzante de la detergencia de tipo no fosfato

Los agentes reforzantes de la detergencia de tipo no fosfato útiles incluyen compuestos basados en aminoácidos, en particular MGDA (ácido metil-glicina-diacético), y sales y derivados de los mismos GLDA (ácido glutámico-N,N-diacético) y sales y derivados de los mismos, IDS (ácido iminodisuccínico) y derivados de los mismos, carboximetil inulina y sales y derivados de los mismos, y mezclas de los mismos. En un aspecto, es especialmente útil el GLDA (sales y derivados de los mismos), siendo la sal tetrasódica del mismo especialmente útil. En un aspecto, MGDA o GLDA están presentes en la composición de detergente para lavavajillas de la invención a un nivel de 0,5% a 20%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% o de aproximadamente 2% a aproximadamente 7% en peso de la composición.

Los agentes reforzantes de la detergencia adecuados para su uso en la presente memoria, además o en lugar de MGDA y/o GLDA, incluyen agentes reforzantes de la detergencia que forman complejos con los iones de la dureza solubles en agua (agente reforzante de la detergencia de precipitación) tales como citratos y agentes

reforzantes de la detergencia que forman precipitados con la dureza (agentes reforzante de la detergencia de precipitación) tales como carbonatos por ejemplo carbonato sódico.

Otros agentes reforzantes de la detergencia de tipo no fosfato orgánicos adecuados incluyen un compuesto basado en aminoácido o un compuesto basado en succinato. Otros aditivos reforzantes de la detergencia adecuados se describen en USP-6.426.229. En un aspecto, los aditivos reforzantes de la detergencia adecuados específicos se incluyen, por ejemplo, ácido aspártico-ácido N-monoacético (ASMA), ácido aspártico-ácido N,N-diacético (ASDA), ácido aspártico-ácido N- monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil)aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil)aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil)glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil)glutámico (SEGL), ácido N- metiliminodiacético (MIDA), ácido alfa- alanin-N,N-diacético (alfa-ALDA), ácido serin-N,N-diacético (SEDA), ácido isoserin-N,N-diacético (ISDA), ácido fenilalanin-N,N-diacético (PHDA), ácido antranílico- ácido N,N-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-ácido N,N-diacético (SLDA), ácido taurin-N,N-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-N,N-diacético (SMDA) y sales de metal alcalino o sales de amonio de los mismos.

En un aspecto, el agente reforzante de la detergencia de tipo no fosfato puede estar presente en la composición detergente para lavavajillas en una cantidad de al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, o al menos 20% en peso de la composición total. En un aspecto, estos aditivos reforzantes de la detergencia están presentes en una cantidad de hasta 50%, de hasta 45%, de hasta 40%, o de hasta 35% en peso de la composición total. En determinados aspectos, la composición contiene 20% en peso de la composición total o menos de agentes reforzantes de la detergencia de tipo fosfato, 10% en peso de la composición total o menos, o la composición está prácticamente exenta de agentes reforzantes de la detergencia de tipo fosfato.

Otros agentes reforzantes de la detergencia de tipo no fosfato contienen homopolímeros y copolímeros de ácidos policarboxílicos y sus sales parcialmente o totalmente neutralizadas, ácidos policarboxílicos monoméricos y ácidos hidrocarboxílicos y sus sales. En un aspecto, las sales de los compuestos anteriormente mencionados incluyen las sales de amonio y/o de metal alcalino, es decir, las sales de litio, sodio y potasio, y son especialmente útiles las sales de sodio.

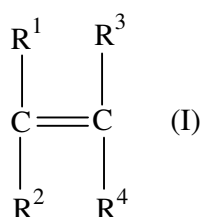
Los ácidos policarboxílicos adecuados incluyen ácidos carboxílicos acíclicos, alicíclicos, heterocíclicos y aromáticos, en cuyo caso contienen al menos dos grupos carboxilo que en cada caso están separados entre sí, en un aspecto por no más de dos átomos de carbono. Los policarboxilatos que comprenden dos grupos carboxilo incluyen, por ejemplo, sales solubles en agua de, ácido malónico, ácido (etil enedioxi) diacético, ácido maleico, ácido diglicólico, ácido tartárico, ácido tartrónico y ácido fumárico. Los policarboxilatos que contienen tres grupos carboxilo incluyen, por ejemplo citrato soluble en agua. Correspondientemente, un ácido hidroxicarboxílico adecuado es, por ejemplo, el ácido cítrico. Otro ácido policarboxílico adecuado es el homopolímero del ácido acrílico. Otros aditivos reforzantes de la detergencia adecuados se han descrito en USP 5.698.504.

#### Polímero sulfonado

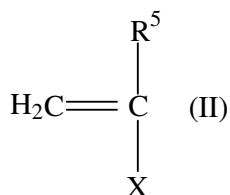
El polímero, si está presente, se usa en cualquier cantidad adecuada de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 50%, de 0,5% a aproximadamente 20%, o de 1% a 10% en peso de la composición detergente para lavavajillas. Los polímeros sulfonados/carboxilados son especialmente adecuados para la composición detergente para lavavajillas de la invención.

Los polímeros sulfonados/carboxilados adecuados descritos en la presente memoria pueden tener un peso molecular promedio en peso inferior o igual a aproximadamente 100.000 Da, inferior o igual a aproximadamente 75.000 Da, inferior o igual a aproximadamente 50.000 Da, de aproximadamente 3000 Da a aproximadamente 50.000 Da, o de aproximadamente 5000 Da a aproximadamente 45.000 Da.

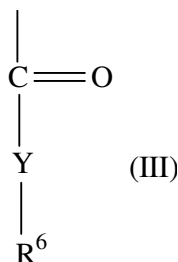
Como se ha indicado en la presente memoria, los polímeros sulfonados/carboxilados pueden comprender (a) al menos una unidad estructural derivada de, al menos, un monómero de ácido carboxílico que tiene la fórmula general (I):



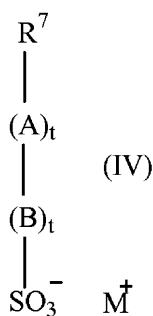
en donde R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> son, independientemente, hidrógeno, metilo, grupo ácido carboxílico o CH<sub>2</sub>COOH y en la que los grupos ácido carboxílico pueden neutralizarse; (b) de forma opcional, una o más unidades estructurales derivadas de, al menos, un monómero no iónico que tiene la fórmula general (II):



en donde  $\text{R}^5$  es hidrógeno, alquilo de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_6$ , o hidroxialquilo de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_6$ , y X es aromático (siendo  $\text{R}^5$  hidrógeno o metilo cuando X es aromático) o X es de la fórmula general (III):



en donde  $\text{R}^6$  es (independientemente de  $\text{R}^5$ ) hidrógeno, alquilo de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_6$ , o hidroxialquilo de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_6$ , e Y es O o N; y al menos una unidad estructural derivada de, al menos, un monómero de ácido sulfónico que tiene la fórmula general (IV):



en donde  $\text{R}^7$  es un grupo que comprende al menos un enlace  $\text{sp}^2$ , A es O, N, P, S o un enlace tipo éster o amido, B es un grupo aromático monocíclico o policíclico o un grupo alifático, cada t es, independientemente entre sí, 0 o 1 y  $\text{M}^+$  es un catión. En un aspecto,  $\text{R}^7$  es un alqueno de  $\text{C}_2$  a  $\text{C}_6$ . En otro aspecto,  $\text{R}^7$  es eteno, buteno o propeno.

Los monómeros de ácido carboxílico adecuados incluyen uno o más de los siguientes: ácido acrílico, ácido maleico, ácido itacónico, ácido metacrílico, o ésteres etoxilados de ácido acrílico, siendo más preferidos los ácidos acrílico y metacrílico. En un aspecto, los monómeros sulfonados preferidos incluyen uno o más de los siguientes: (met)alilsulfonato de sodio, sulfonato de vinilo, fenil(met)aliléter sulfonato de sodio, o ácido 2-acrilamido-metilpropanosulfónico. En un aspecto, los monómeros no iónicos preferidos incluyen uno o más de los siguientes: (met)acrilato de metilo, (met)acrilato de etilo, (met)acrilato de t-butilo, metil(met)acrilamida, etil(met)acrilamida, t-butil(met)acrilamida, estireno, o  $\alpha$ -metilestireno.

En un aspecto, el polímero comprende los siguientes niveles de monómeros: de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90% en peso del polímero de uno o más monómeros de ácido carboxílico; de aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 40% en peso del polímero de uno o más monómeros de ácido sulfónico; y opcionalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 20% en peso del polímero de uno o más monómeros no iónicos. Un polímero especialmente adecuado comprende de aproximadamente 70% a aproximadamente 80% en peso del polímero de, al menos, un monómero de ácido carboxílico y de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% en peso del polímero de, al menos, un monómero de ácido sulfónico.

El ácido carboxílico puede ser ácido (met)acrílico. El monómero de ácido sulfónico de forma típica es uno de las siguientes: ácido 2-acrilamidometil-1-propanosulfónico, ácido 2-metacrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, ácido 3-metacrilamido-2-hidroxipropanosulfónico, ácido alilsulfónico, ácido metalilsulfónico, ácido aliloxibencenosulfónico, ácido metaliloxibencenosulfónico, ácido 2-hidroxi-3-(2-propeniloxy)propanosulfónico, ácido 2-metil-2-propeno-1-sulfónico, ácido estirenosulfónico, ácido vinilsulfónico, acrilato de 3-sulfopropilo, metacrilato de 3-sulfopropilo, sulfometilacrilamida, sulfometilmetacrilamida, y sales solubles en agua de los mismos. El monómero de ácido sulfónico insaturado es en un aspecto ácido 2-acrilamido-2-propanosulfónico (AMPS).

Los polímeros comerciales incluyen: Alcosperse 240, Aquatreat AR 540 y Aquatreat MPS comercializados por Alco Chemical; Acumer 3100, Acumer 2000, Acusol 587G y Acusol 588G comercializados por Rohm & Haas; Goodrich K-798, K-775 y K-797 comercializados por BF Goodrich; y ACP 1042 comercializado por ISP technologies Inc. Son polímeros especialmente adecuados Acusol 587G y Acusol 588G comercializados por Rohm & Haas.

En los polímeros, todos o alguno de los grupos ácido carboxílico o ácido sulfónico pueden estar presentes en forma neutralizada, es decir, el átomo de hidrógeno ácido del grupo ácido carboxílico y/o sulfónico en alguno o en todos los grupos ácidos puede estar sustituido con iones de metal, por ejemplo, iones de metales alcalinos y, en particular, iones de sodio.

#### Auxiliares de secado

En otra realización, la composición detergente para lavavajillas de la invención comprende un coadyuvante de secado. "Coadyuvante de secado" en la presente memoria significa un agente capaz de hacer disminuir la cantidad de agua que queda en los artículos lavados, en particular en artículos de plástico que tienen mayor tendencia a permanecer húmedos después del proceso de lavado debido a su naturaleza hidrófoba.

Coadyuvantes de secado adecuados incluyen poliésteres, especialmente poliésteres aniónicos derivados de ácido tereftálico, ácido 5-sulfoisoftálico o una sal del ácido 5-sulfoisoftálico, etilenglicol o polietilenglicol, propilenglicol o polipropilenglicol y monoalquiléteres de polialquilenglicol, de forma opcional junto con otros monómeros que tienen de 3 a 6 grupos funcionales que dan lugar a policondensación, especialmente grupos funcionales ácido, alcohol o éster. Poliésteres adecuados para usar como coadyuvantes de secado se describen en WO 2008/110816 y preferiblemente tienen una o más de las siguientes propiedades:

- (a) un peso molecular promedio en número de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 25.000 Da, o de aproximadamente 1200 Da a aproximadamente 12.000 Da.
- (b) un punto de reblandecimiento superior a aproximadamente 40 °C, de aproximadamente 41 °C a aproximadamente 200 °C, o incluso de 80 °C a aproximadamente 150 °C;
- (c) una solubilidad superior a 6% en peso en agua de 3 ° de dureza alemana a 200 °C. A 30 °C la solubilidad será de forma típica superior a aproximadamente 8% en peso, a 40 °C y 50 °C, la solubilidad será de forma típica superior a aproximadamente 40% medida en agua de 3 ° de dureza alemana.

Otros auxiliares de secado adecuados incluyen compuestos específicos de policarbonato, poliuretano y/o poliurea-poliorganosiloxano, o compuestos precursores de los mismos de los tipos de carbonato cíclico reactivo y urea, tal como se describe en USPA 2010/0041574 A1 y en USPA 2010/0022427 A1.

También puede lograrse un secado mejorado mediante el uso de tensioactivos no iónicos, tales como:

(a)  $R^1O[CH_2CH(CH_3)O]_x[CH_2CH_2O]_y[CH_2CH(CH_3)O]_zCH_2CH(OH)R^2$ , en los que  $R^1$  representa un hidrocarburo alifático lineal o ramificado que tiene de 4 a 22 átomos de carbono o mezclas de los mismos y  $R^2$  representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que tiene de 2 a 26 átomos de carbono o mezclas de los mismos, x y z representan números enteros de 0 a 40, e y representa un número entero de al menos 15, o de 15 a 50. Ver, por ejemplo, WO 2009/033972.

(b)  $RO[CHCH(R^a)O]_l[CH_2CH_2O]_m[CH_2CH(R^1)O]_nC(O)R^2$ , donde R es un radical alquilo ramificado o no ramificado que tiene de 8 a 16 átomos de carbono,  $R^a$  y  $R^1$ , independientemente entre sí, son hidrógeno o un radical alquilo ramificado o no ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono,  $R^2$  es un radical alquilo no ramificado que tiene de 5 a 17 átomos de carbono; l y n son, independientemente entre sí, un número entero de 1 a 5 y m es un número entero de 13 a 35, como se describe en USPA 2008/016721.

Ejemplos de materiales adecuados incluyen Plurafac LF731 o Plurafac LF-7319 (BASF) y la gama Dehyquart® CSP y Polyquart® (Cognis).

En un aspecto, dichos tensioactivos no iónicos se utilizan en combinación con uno o más de:

- (a) un polímero sulfonado; o
- (b) alcoholes alcoxlados, especialmente alquiletoxilatos en los que la cadena alquílica tiene de 8 a 14 átomos de carbono, con un promedio de 4 a 10, o de 6 a 8 etoxilatos como, por ejemplo, Lutensol TO7 suministrado por BASF.

En un aspecto, la composición detergente para lavavajillas de la invención comprende de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5% y especialmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 4% en peso de la composición de un coadyuvante de secado.

## 5 Silicatos

Los silicatos adecuados son silicatos de sodio tales como disilicato de sodio, metasilicato de sodio y los filosilicatos cristalinos. Los silicatos, si están presentes, lo están a un nivel de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, o de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, en peso de la composición detergente para lavavajillas.

## 10 Blanqueador

Los blanqueadores inorgánicos y orgánicos son sustancias activas limpiadoras adecuadas para su uso en la presente invención. Los blanqueadores inorgánicos incluyen sales perhidratadas tales como sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato. Las sales inorgánicas perhidratadas son normalmente sales de metales alcalinos. La sal inorgánica de perhidrato puede incluirse como sólido cristalino sin ninguna otra protección adicional. De forma alternativa, la sal puede estar recubierta.

Los percarbonatos de metal alcalino, especialmente el percarbonato sódico, son perhidratos preferidos de uso en la presente invención. El percarbonato se incorpora con máxima preferencia a los productos en una forma recubierta que proporciona estabilidad al producto. Un material de recubrimiento adecuado que proporciona estabilidad al producto comprende una sal mixta de un sulfato de metal alcalino soluble en agua. Dichos recubrimientos junto con los procesos de recubrimiento ya han sido descritos en USP 4.105.827. La relación entre el peso del material de recubrimiento de sal mixta y el percarbonato se encuentra en el intervalo de 1: 200 a 1: 4, de 1: 99 a 1: 9, o de 1: 49 a 1: 19. En un aspecto, la sal mezclada es de sulfato sódico y de carbonato sódico que tiene la fórmula general  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot n \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$ , en donde n es de 0,1 a 3, de 0,2 a 1,0 o de 0,2 a 0,5.

Otro material de recubrimiento adecuado que proporciona estabilidad al producto comprende silicato sódico con una relación de  $\text{SiO}_2$ :  $\text{Na}_2\text{O}$  de 1,8: 1 a 3,0: 1, o 1,8: 1 a 2,4: 1, y/o metasilicato de sodio, en un aspecto, aplicado a un nivel de 2% a 10%, (normalmente de 3% a 5%) de  $\text{SiO}_2$  en peso de la sal inorgánica perhidratada. El silicato de magnesio también puede incluirse en el recubrimiento. También son adecuados recubrimientos que contienen sales silicato y borato o ácido bórico o sus sales inorgánicas.

También se pueden utilizar de forma ventajosa en la presente invención otros recubrimientos que contienen ceras, aceites y jabones grasos.

El peroximonopersulfato de potasio es otra sal perhidratada inorgánica de utilidad en la presente memoria.

Los blanqueadores orgánicos típicos son los peroxiácidos orgánicos, incluidos los diacilperóxidos y los tetraacilperóxidos, especialmente el ácido diperoxidodecanedioico, el ácido diperoxitetradecanodioico y el ácido diperoxihexadecanodioico. El dibenzoil peróxido es un peroxiácido orgánico preferido en la presente invención. Los ácidos monoperazelaico y diperazelaico, los ácidos monoperbrasílico y diperbrasílico y el ácido N-ftalilaminoperoxicaproyico son también adecuados en la presente memoria.

El peróxido de diacilo, especialmente el peróxido de dibenzoilo, debería de forma típica estar presente en forma de partículas que tienen un diámetro medio ponderal de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 micrómetros, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 micrómetros, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 micrómetros. En un aspecto, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 90% de las partículas tienen un tamaño menor a 10 micrómetros, o menor a 6 micrómetros. Se ha descubierto que los peróxidos de diacilo contenidos en el anterior intervalo de tamaño de partículas también proporcionan mejor capacidad de eliminación de manchas, especialmente de la vajilla de plástico, minimizando a la vez la deposición y formación de películas no deseables durante el uso en lavavajillas, que las partículas de peróxido de diacilo de mayor tamaño. El tamaño de partículas del peróxido de diacilo óptimo permite al formulador obtener una buena eliminación de las manchas con un bajo nivel de peróxido de diacilo, lo que reduce la deposición y formación de películas. Al contrario, a medida que aumenta el tamaño de partículas del peróxido de diacilo, más peróxido de diacilo se necesita para eliminar bien las manchas, lo cual aumenta la deposición sobre las superficies encontrada durante el proceso de lavado de vajillas.

Los blanqueadores orgánicos típicos adicionales incluyen los peroxiácidos, siendo ejemplos particulares los alquilperoxiácidos y los arilperoxiácidos. Los representantes preferidos son (a) ácido peroxibenzoico y sus derivados de anillo sustituido, como los ácidos alquilperoxibenzoicos, pero también ácido peroxi- $\alpha$ -naftoico y monoperftalato de magnesio, (b) peroxiácidos alifáticos o alifáticos sustituidos, tales como ácido peroxiláurico, ácido peroxiestearico, ácido  $\epsilon$ -ftalimidoperoxicaproyico, ácido [ftaloiminoperoxihexanoico (PAP)], ácido o-carboxibenzamidoperoxicaproyico, ácido N-nonenilamidoperoxidaproyico, y N-nonenilamidopersuccinatos, y (c) ácidos peroxidicarbonílicos alifáticos y aralifáticos, tales como ácido 1,12-diperoxycarboxílico, ácido 1,9-diperoxiazelaico, ácido diperoxisebáico, ácido diperoxibrasílico, los ácidos diperoxiftálicos, ácido 2-decildiperoxibutano-1,4-dioico, N,N-tereftaloildi(ácido 6-aminopercaproyico).

Activadores del efecto blanqueador

Los activadores del blanqueador son de forma típica precursores de perácidos orgánicos que potencian la acción blanqueadora durante el lavado a temperaturas de 60 °C e inferiores. Los activadores del blanqueador adecuados para su uso en la presente invención incluyen compuestos que, en condiciones de perhidrólisis, proporcionan ácidos peroxicarboxílicos alifáticos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, en particular de 2 a 4 átomos de carbono, y/u ácido perbenzoico opcionalmente sustituido. Las sustancias adecuadas contienen grupos O-acilo y/o N-acilo del número de átomos de carbono especificado y/o grupos benzoilo opcionalmente sustituidos. Se da preferencia a alquilendiaminas poliaciladas, en particular tetraacetiletilendiamina (TAED), derivados acilados de triazina, 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-nonanoiloxibenzenosulfonato o isononanoiloxibenzenosulfonato (n-NOBS o iso-NOBS), anhídridos carboxílicos, en particular anhídrido ftálico, alcoholes polihidroxilados acilados, en particular triacetina, diacetato de etilenglicol y 2,5-diacetoxi-2,5-dihidrofurano y también citrato de trietilacetilo (TEAC). Los activadores del blanqueador, si se han incluido en las composiciones detergentes para lavavajillas de la invención, están en un nivel de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10%, o de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2% en peso de la composición total.

Catalizador del blanqueador

Los catalizadores del blanqueador preferidos de uso en la presente invención incluyen el triazaciclono-nano de manganeso y complejos relacionados (US-4246612, US-5227084); la bispiridilamina de Co, Cu, Mn y Fe y complejos relacionados (US-5114611) y el acetato de pentamina cobalto(III) y complejos relacionados (US-4810410). Una descripción completa de los catalizadores del blanqueador adecuados para su uso en la presente invención se puede encontrar en USP 6.599.871, página 34, línea 26 a página 40, línea 16. Los catalizadores del blanqueador, si se han incluido en las composiciones detergentes para lavavajillas de la invención, están en un nivel de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10%, o de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2% en peso de la composición total.

Agentes para el cuidado de los metales

Los agentes para el cuidado del metal pueden evitar o reducir el deslustre, la corrosión u oxidación de los metales, incluyendo aluminio, acero inoxidable y metales no ferrosos, tales como plata y cobre. Los ejemplos adecuados incluyen uno o más de los siguientes:

(a) benzotriazoles, incluyendo benzotriazol o bis-benzotriazol y derivados sustituidos de los mismos. Los derivados de benzotriazol son aquellos compuestos cuyos sitios de sustitución disponibles en el anillo aromático están parcial o totalmente sustituidos. Los sustituyentes adecuados incluyen grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada, y los grupos hidroxilo, tio, fenilo o halógeno tales como flúor, cloro, bromo y yodo.

(b) sales y complejos metálicos seleccionados del grupo que consiste en sales y/o complejos de cinc, manganeso, titanio, circonio, hafnio, vanadio, cobalto, galio y cerio, estando los metales en los estados de oxidación II, III, IV, V o VI. En un aspecto, las sales de metales y/o los complejos de metales pueden escogerse del grupo que consiste en sulfato de Mn (II), citrato de Mn(II), estearato de Mn(II), acetilacetato de Mn(II), K<sub>2</sub>TiF<sub>6</sub>, K<sub>2</sub>ZrF<sub>6</sub>, CoSO<sub>4</sub>, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, sales de cinc, por ejemplo, sulfato de cinc, hidrocincita o acetato de cinc.

(c) silicatos, incluyendo silicato de sodio o potasio, disilicato de sodio, metasilicato de sodio, filosilicato cristalino y mezclas de los mismos.

Otras sustancias orgánicas e inorgánicas adecuadas con actividad redox que actúan como inhibidores de la corrosión de plata/cobre se describen en USP 5.888.954.

En un aspecto, la composición detergente para lavavajillas de la invención comprende de 0,1% a 5%, de 0,2% a 4% o de 0,3% a 3% en peso de la composición total de un agente para el cuidado de metales. En un aspecto, el agente para el cuidado de metales comprende una sal de cinc.

Método de uso

Se describe un método de lavado de vajillas en lavavajillas utilizando un aspecto de la composición detergente para lavavajillas de los solicitantes descrita en la presente memoria descriptiva, comprendiendo dicho método la etapa de colocar la composición detergente para lavavajillas en un dispensador de producto o en un dispositivo dispensador autodosificador y liberarlo durante el ciclo de lavado principal.

Forma de dosis unitaria

En un aspecto, se describe una dosis unitaria que comprende, de aproximadamente 10 gramos a aproximadamente 25 gramos o de aproximadamente 12 gramos a aproximadamente 24 gramos de cualquier aspecto de la composición detergente para lavavajillas de los solicitantes descrita en la presente memoria descriptiva.

En un aspecto, se describe un elemento de dosificación de detergente para lavavajillas para usar en un dispositivo autodosificador, comprendiendo el elemento dosificador cualquier aspecto de la composición detergente para lavavajillas de los solicitantes descrita en la presente memoria descriptiva.

Descripción detallada adicional de dosis unitaria

En un aspecto, la composición detergente para lavavajillas de la invención es en forma de dosis unitaria. Los productos detergentes para lavavajillas en forma de dosis unitaria incluyen pastillas, cápsulas, saquitos, bolsas, etc. En un aspecto, para su uso en la presente invención las pastillas envueltas con una película soluble en agua y bolsas solubles en agua. El peso de la composición de la invención es de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 gramos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 gramos, o incluso de 14 a 22 gramos. Estos pesos son altamente convenientes para un ajuste automático del dispensador de producto detergente en el lavavajillas. En los casos de productos de dosis unitaria que tienen un material soluble que rodea la composición detergente para lavavajillas, el material soluble en agua no se considera como parte de la composición.

En un aspecto, la forma de dosis unitaria es una bolsa soluble en agua (es decir, una película soluble en agua que rodea una composición detergente para lavavajillas), en un aspecto, una bolsa multicompartimental que tiene una pluralidad de películas que forman una pluralidad de compartimentos. Esta configuración contribuye a la flexibilidad y a la optimización de la composición. Esto permite la separación y la liberación controlada de diferentes ingredientes. En un aspecto un compartimento contiene una composición detergente para lavavajillas en forma sólida y otro compartimento contiene una composición detergente para lavavajillas en forma líquida.

En un aspecto, en realizaciones de bolsa multicompartimental dos compartimentos diferentes pueden contener dos agentes limpiadores diferentes. En un aspecto, las películas de dichos dos compartimentos tienen perfiles de disolución diferentes, lo que permite la liberación de los mismos o de diferentes agentes en momentos diferentes. Por ejemplo, el agente de un compartimento (primer compartimento) puede liberarse en las etapas iniciales del proceso de lavado para facilitar la retirada de suciedad y un segundo agente de otro compartimento (segundo compartimento) puede liberarse al menos dos minutos, o incluso al menos cinco minutos después que el agente del primer compartimento.

En un aspecto, se describe una bolsa multicompartimental que comprende dos compartimentos cara a cara superpuestos a otro compartimento, en donde al menos dos compartimentos diferentes contienen dos composiciones detergentes para lavavajillas diferentes.

Según otro aspecto de la invención, también se proporciona un elemento de dosificación de detergente para lavavajillas para usar en un dispositivo autodosificador, comprendiendo el elemento de dosificación una composición detergente para lavavajillas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores. “Dispositivo autodosificador” significa en la presente memoria un dispositivo que se coloca en el lavavajillas y que puede albergar una pluralidad de dosis para suministrar en diferentes lavados. El usuario no necesita cargar el detergente para cada lavado, ya que el dispositivo autodosificador las suministra de forma automática. Cada lavado puede utilizar una o más dosis

Un envase multicompartimental se forma mediante una pluralidad de materiales de envoltura solubles en agua que conforman una pluralidad de compartimentos, uno de los compartimentos contendría la composición detergente para lavavajillas de la invención, otro compartimento puede contener una composición líquida, la composición líquida puede ser acuosa (es decir comprende más de 10% de agua en peso de la composición líquida) y el compartimento puede fabricarse con un material soluble en agua templada. En algunas realizaciones, el compartimento que comprende la composición detergente para lavavajillas de la invención está fabricado con un material soluble en agua fría. Esto permite la separación y la liberación controlada de diferentes ingredientes. En otras realizaciones, todos los compartimentos están hechos de material soluble en agua templada.

Los envases adecuados comprenden al menos dos compartimentos cara-a-cara superpuestos (es decir, apilados) sobre otro compartimento, las bolsas son especialmente adecuadas. Esta disposición contribuye a la compacidad, robustez y resistencia del envase, de forma adicional, minimiza la cantidad de material soluble en agua necesario. Solo se necesitan tres trozos de material para formar tres compartimentos. La resistencia del envase también permite el uso de películas muy delgadas sin comprometer la integridad física del envase. El envase también es muy fácil de usar porque los compartimentos no necesitan plegarse para usarse en los dispensadores automáticos de geometría fija. Al menos dos de los compartimentos del envase contienen dos composiciones detergentes para lavavajillas diferentes. Por “composiciones diferentes” se entiende en la presente memoria composiciones detergentes para lavavajillas que se diferencian en al menos un ingrediente.

En un aspecto, al menos uno de los compartimentos contiene una composición sólida y otro compartimento contiene una composición detergente para lavavajillas líquida acuosa, estando las composiciones de forma típica en una relación de peso de sólido a líquido de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:20, de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 2:1 o de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 5:1. Este tipo de envase es muy versátil porque puede albergar composiciones que tienen un amplio espectro de valores de la relación sólido:líquido. Las bolsas que tienen una elevada relación sólido:líquido son especialmente preferidas porque muchos de los ingredientes detergentes son más adecuados para su uso en forma sólida, preferiblemente en forma de polvo. La relación sólido:líquido definida en la presente memoria se refiere a la relación entre el peso de todas las composiciones sólidas y el peso de todas las composiciones líquidas del envase.

Las relaciones de peso sólido:líquido adecuadas son de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 18:1, o de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1. Estas relaciones en peso son adecuadas en casos en los que la mayoría de los ingredientes del detergente están en forma líquida.

En un aspecto, los dos compartimentos cara-a-cara contienen composiciones detergentes para lavavajillas líquidas, que pueden ser iguales o diferentes y otro compartimento contiene una composición detergente para lavavajillas, por ejemplo en forma de polvo, en un aspecto, un polvo densificado. La composición sólida contribuye a la resistencia y fortaleza del envase.

Por razones de encaje, especialmente en un lavavajillas, los productos en forma de dosis unitaria de la presente memoria tienen una base cuadrada o rectangular y una altura de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 5 cm, o de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 4 cm. En un aspecto, el peso de la composición sólida es de aproximadamente 5 gramos a aproximadamente 20 gramos, o de aproximadamente 10 gramos a aproximadamente 15 gramos y el peso de las composiciones líquidas es de aproximadamente 0,5 gramos a aproximadamente 4 gramos, o de aproximadamente 0,8 gramos a aproximadamente 3 gramos.

En un aspecto, al menos dos de las películas que forman compartimentos diferentes tienen solubilidades diferentes en las mismas condiciones. Esto permite liberar las composiciones que envuelven parcial o totalmente en diferentes momentos.

La liberación controlada de los ingredientes de una bolsa multicompartimental se puede conseguir modificando el espesor de la película y/o la solubilidad del material pelicular. La solubilidad del material en forma de película puede ser retardada, por ejemplo, mediante la reticulación de la película como se describe en USPA 2002/0198125A1. Otras películas solubles en agua diseñadas para ser liberadas en el aclarado se describen en US-4.765.916 y US-4.972.017. El recubrimiento ceroso (ver USP 5.453.216) de las películas puede ayudar con la liberación en el aclarado. Se describen medios de liberación controlados por el pH en USP 5.453.216, especialmente polisacárido aminoacetilado que tiene un grado de acetilación selectivo.

Otros medios de obtener una liberación retardada mediante bolsas multicompartimentales con diferentes compartimentos, en donde los compartimentos están hechos de películas que tienen diferente solubilidad se enseñan en UPS 6 727.215.

#### Dispositivo de suministro autodosificador

Los elementos dosificadores de la presente invención se pueden colocar en un cartucho de suministro. Los elementos de dosificación pueden tener una forma alargada y estar dispuestos en una disposición en serie formando un cartucho de suministro que es la recarga de un dispositivo dispensador autodosificador. El cartucho de suministro debe colocarse en un dispositivo de suministro autodosificador. Puede encontrarse una descripción adecuada de dispositivos autodosificadores en USPA 2009/0170743 A1, USPA 2008/0293604 A1, USPA 2009/0308414 A1 y USPA 2010/0065084 A1.

#### Parte experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones y aspectos de la presente invención y no deben considerarse como limitativos del ámbito de la misma.

En la descripción experimental que sigue y en el resto de la memoria, se utilizan las siguientes abreviaturas: PI (inhibidor de proteinasa), ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar);  $\mu$ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (mol); mmol (milimol);  $\mu$ mol (micromol); nmol (nanomol); gm (gramo); mg (miligramo);  $\mu$ g (microgramo); pg (picogramo); L o l (litro); ml y mL (mililitros);  $\mu$ l o  $\mu$ L (microlitro); cm (centímetro); mm (milímetro);  $\mu$ m (micrómetro); nm (nanómetro); U (unidades); V (voltio); MW (peso molecular); sec (segundo); min(s) (minuto/minutos); h(s) o hr(s) (hora/horas); C (grados centígrados); ND (no determinado); rpm (revoluciones por minuto); GH (grados de dureza alemana); H<sub>2</sub>O (agua); dH<sub>2</sub>O (agua desionizada); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); bp (par de bases); kb (par de kilobases); kD (kilodaltons); cDNA (ADN copia o ADN complementario); DNA (ácido desoxirribonucleico); ssDNA (ADN monocatenario); dsDNA (ADN bicatenario); RNA (ácido ribonucleico); MgCl<sub>2</sub> (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro sódico); BPN' (subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*); PB92 (subtilisina de *Bacillus clausii*); w/v (peso/volumen); v/v (volumen/volumen); w/w (peso/peso); g (gravedad); OD (densidad óptica); ppm (partes por millón); OD<sub>280</sub> (densidad óptica a 280 nm); OD<sub>600</sub> (densidad óptica a 600 nm); A<sub>405</sub> (absorbancia a 405 nm); PAGE (electroforesis en gel de poliácridamida); PBS (solución salina tamponada).

con fosfato [150 mM NaCl, 10 mM de tampón de fosfato sódico, pH 7,2]; PEG (polietilenglicol); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); SDS (dodecilsulfato de sodio); TRIS o Tris (tris(hidroximetil)aminometano); HEPES (ácido N[2Hidroxietil]piperazina-N[2etanosulfónico]); HBS (solución salina tamponada con HEPES); TrisHCl (tris[Hidroximetil]aminometano-hidrocloreto); DMSO (sulfóxido de dimetilo); SA (ácido sinapínico (ácido 5,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico)); TCA (ácido tricloroacético); HPLC (cromatografía líquida de alta resolución); *Taq* (ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*); Klenow (fragmento de Klenow largo de ADN polimerasa I); EDTA (ácido etilendiaminotetracético); bla (gen de resistencia a la  $\beta$ -lactamasa o a la ampicilina); HDL (líquido de alta densidad); HDD (detergente en polvo de acción intensiva); HSG (detergente granular muy espumante); CEE (Europa central y del este); WE (Europa occidental); NA, cuando se usa en referencia a detergentes (Norte América); Japón y JPN, cuando se usa en referencia a detergentes (Japón); CFT (Centro de Materiales de Prueba, Vlaardingen, Países Bajos); P&G y Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA); Corning (Corning Life Sciences, Corning, NY); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica de los EE. UU.); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA); Molecular Devices (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA); Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Suiza); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Monsanto (Monsanto Co., St. Louis, MO); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Alemania); BASF (BASF Co., Florham Park, NJ); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, España); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, Países Bajos); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, MI); RB (Reckitt-Benckiser, Slough, Reino Unido).

### Ejemplo 1

#### Construcción de proteasas variantes

Las proteasas variantes PX4 y PX5 se pueden crear utilizando uno o más de entre diversos métodos estándar bien conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteasa variante PX4 o PX5 se puede construir llevando a cabo mutagénesis dirigida al sitio estándar de un DNA plasmídico que codifica una secuencia de nucleótidos que codifica proteasa de *B. lentus* GG36. Una secuencia de nucleótidos que codifica proteasa GG36 es la siguiente:

gtgagaagcaaaaaattgtggatcgctgcgctgaccgcactactcatttctgttgccttcagttcatcgatcgcatcggtcgtgaagaagcaaaaagaaaaatatttaatt  
ggcttaaatgagcagggaagctgtcagtgagttgtagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctgaggaagaggaagtcgaaattgaattgctcat  
gaattgaacgattcctgtttatccgttgagtttaagcccagaagatgtggacgcgcttgagctcgatccagcgatttcttatattgaagagatgcagaagtaacgaca  
atgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATACCCGTGGATTGACAGGTTCT  
TGGTGTAAAGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTT  
TGTAACAGGGGAACCATCCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTA  
AACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACCTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCG  
GTTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTG  
AGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGT  
GTAGCGGCATCTGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCG  
GAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGACCCAGGT  
GTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTT  
GCAGGTGCAGCAGCCCTTGTAAACAAAGAACCCATCTTGGTCCAAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAAT  
ACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCTGCAACTCGTTA

Dicha secuencia de ADN comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de señal (mostrada arriba en letras minúsculas no subrayadas), una secuencia de nucleótidos que codifica un propéptido (mostrada en letras minúsculas subrayadas) y una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido GG36 maduro (mostrada arriba en letras mayúsculas)

La secuencia de aminoácidos de la proteasa variante madura denominada en la presente memoria PX4 con sustituciones de aminoácidos N76D/S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A con respecto a la SEQ ID N.º:1 (utilizando numeración BPN' determinada por alineación de la secuencia de polipéptidos PX4 con la secuencia de polipéptidos BPN' mostrada en SEQ ID N.º:2) es:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGSVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNHGHGTHVAGTIAALDNS  
IGVLGVAPRAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNRMHVANLSLGLQAPSATLEQAVNSATSRGVLVVAAS  
GNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAA  
LVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR

La secuencia de aminoácidos de la proteasa variante madura denominada en la presente memoria PX5 con sustituciones de aminoácidos N76D/S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A/S188D/V244R con respecto a la SEQ ID N.º:1 (utilizando numeración BPN' determinada por alineación de la secuencia de polipéptidos PX5 con la secuencia de polipéptidos BPN' mostrada en SEQ ID N.º:2) es:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGSVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHGTHVAGTIAALDNS  
IGVLGVAPRAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNRMHVNLSLGLQAPSATLEQAVNSATSRGVLVVAAS  
GNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRADFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAA  
ALVKQKNPSWSNRQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR

Procedimientos de mutagénesis dirigida al sitio ilustrativos bien conocidos en la técnica incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, el método de mutagénesis dirigida a múltiples sitios incorporado al kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios (QCMS; Agilent Technologies - Stratagene, La Jolla, CA), que permite de forma simultánea la mutagénesis dirigida al sitio de ADN plasmídico en hasta cinco sitios diferentes. Los ácidos nucleicos que codifican las proteasas variantes PX4 y PX5 pueden ser obtenidas también fácilmente a partir de, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica proteasa GG36 por el experto en la técnica utilizando métodos de síntesis de genes y/o de fusión en PCR (ver, por ejemplo, U.S.P.A. 2006/0252155).

También se pueden obtener ácidos nucleicos que codifican las proteasas variantes PX4 y PX5 mediante síntesis química utilizando, por ejemplo, el método clásico de la fosforamidita (ver, por ejemplo, Beaucage y col., Tetrahedron Letters 22:1859-69 (1981)) o el método descrito por Matthes y col., EMBO J. 3:801-05 (1984), por ejemplo, tal y como es practicado de forma típica en métodos de síntesis automatizados. De forma alternativa, se pueden adquirir ácidos nucleicos que codifican las proteasas variantes PX4 y PX5 de diversas fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company (Midland, Texas) (www.oligos.com), The Great American Gene Company (www.genco.com), Operon Technologies, Inc. (Alameda, Calif.) (ahora Qiagen, ver www.qiagen.com), o DNA2.0 (Menlo Park, CA). Otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados se describen, por ejemplo, en Itakura y col., Annu. Rev. Biochem. 53:323 (1984) y Itakura y col., Science 198:1056 (1984).

En un aspecto, por ejemplo, si se utiliza síntesis de genes para crear el ácido nucleico que codifica PX4 o PX5, dicho ácido nucleico se puede designar con sitios de restricción de flanqueo como, por ejemplo, BglIII, que se puede utilizar para clonar el ácido nucleico que codifica PX4 o PX5 para formar un plásmido de expresión (p. ej., el plásmido de expresión de *B. subtilis*) también digerido con BglIII, por ejemplo, el plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36 descrito en la presente memoria. Este vector de expresión de pHPLT *B. subtilis* contiene el promotor de LAT de *B. licheniformis* (Plat), el promotor de HPA2 y elementos adicionales de pUB110 (ver, por ejemplo, McKenzie y col., Plasmid, 15:93-103 (1986)), incluido un gen replicasa (reppUB), un gen de resistencia a la neomicina (neo), y un marcador de resistencia a la bleomicina (bleo) (ver también la Figura 4 de US-6.566.112). El mapa plasmídico de pHPLT-GG36 se proporciona en la Figura 2 y la secuencia de casete de expresión se proporciona a continuación. Para el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange® (QCMS Kit) o los métodos de fusión en PCR descritos en la presente memoria, el plásmido pHPLT-GG36 que comprende el ácido nucleico que codifica *B. lentus* GG36 se puede utilizar como la plantilla de DNA para obtener las proteasas variantes PX4 y PX5 utilizadas en la invención. En un formato ilustrativo, los cebadores nucleotídicos que contienen las mutaciones deseadas de PX4 o de PX5 se hibridan con el ácido nucleico que codifica GG36 en el plásmido pHPLT-GG36 y se extienden con una ADN polimerasa según se describe en el manual de producto de Stratagene QCMS y en USPA 2006/0252155 para fusión en PCR. La Tabla 1-1 proporciona secuencias de nucleótidos ilustrativas de cebadores que se pueden utilizar para la mutagénesis dirigida al sitio.

| Tabla 1-1. Cebadores ilustrativos utilizados para el método de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® |                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Secuencia de cebador                                                                                     | Nombre de cebador |
| CGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATTGGCGTTC (SEQ ID N.º:12)                                                   | N76D              |
| GGCGTTCTTGCGGTAGCGCCGAACGCGGAACCTATACG (SEQ ID N.º:13)                                                   | S87N              |
| CCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTG (SEQ ID N.º:14)                                                | G118R             |
| TAATTTGAGTTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAGC (SEQ ID N.º:15)                                             | S128L,P129Q,S130A |
| CCAAAACAACAACCGCGCCGATTTTTCACAGTATGGCGC (SEQ ID N.º:16)                                                  | S188D             |
| ATCTTGGTCCAATCGTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGC (SEQ ID N.º:17)                                            | V244R             |

La incorporación de mutaciones en cada proteasa variante PX4 y PX5 se puede llevar a cabo en múltiples ciclos hasta que se obtiene la proteasa variante final. La amplificación de círculo rodante (GE Healthcare, Piscataway, NJ) se puede utilizar del modo descrito por el fabricante para ampliar los plásmidos mutantes contenidos en las reacciones de QCMS o reacciones de ligado por fusión en PCR antes de la transformación en células de *B. subtilis* (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Células competentes de *B. subtilis* (fenotipo:  $\Delta aprE$ ,  $\Delta nprE$ ,  $oppA$ ,  $\Delta spoII E$ ,  $degU Hy32$ ,  $\Delta amyE(xylR,pxyIA-comK)$ ) se pueden transformar con los plásmidos variantes o 1  $\mu$ L de la reacción de amplificación de círculo rodante para obtener células transformantes proteasa positivas utilizando procedimientos conocidos en la técnica (ver, p. ej., WO 02/14490). Las bacterias se pueden hacer competentes mediante la inducción del gen *comK* controlando un promotor inducible de xilosa (ver, por ejemplo, Hahn y col., Mol. Microbiol. 21:763-775 (1996)). Los clones positivos de proteasa variante se pueden seleccionar en placas de leche desnatada/agar, aislar, secuenciar y la proteína de proteasa variante producida en cultivos de matraz de agitación para generar cantidades significativas de muestras de enzima para su caracterización.

**Ejemplo 2***Producción de proteasas variantes en Bacillus subtilis*

Las proteasas variantes se obtuvieron cultivando las *B. subtilis* transformantes durante la noche a 37 °C en 10 ml de medio TSB (caldo a base de triptona y soja). Se transfirió una alícuota de 250 µl del cultivo utilizado durante la noche a un medio definido basado en MOPS en un matraz de agitación de 100 ml y se cultivaron a 37 °C durante 68 horas. El medio definido se preparó esencialmente como se conoce en la técnica (ver, Neidhardt *et al.*, J Bacteriol, 119: 736-747, 1974), salvo que NH<sub>4</sub>Cl, FeSO<sub>4</sub>, y CaCl<sub>2</sub> se dejaron fuera del medio de base, se utilizó 3 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y el medio de base se suplementó con 60 mM de urea, 75 g/l de glucosa y 1% de Soytone. Además, los micronutrientes se prepararon como una solución madre 100 veces más concentrada que contenía en un litro: 400 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100 mg de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 100 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50 mg de CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 100 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 100 mg de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 100 mg de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M y 10 ml de citrato sódico 0,5 M. Las proteasas de interés se aislaron del medio de cultivo.

Abreviaturas utilizadas en el Ejemplo 3

En el ejemplo, las identificaciones abreviadas de los componentes tienen los siguientes significados:

|                       |   |                                                                                                           |
|-----------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Carbonato             | : | Carbonato sódico anhidro                                                                                  |
| STPP                  | : | Tripolifosfato sódico anhidro                                                                             |
| Silicato              | : | Silicato de sodio amorfo (SiO <sub>2</sub> :Na <sub>2</sub> O = de 2:1 a 4:1)                             |
| Alcosperse 240-D      | : | Polímero sulfonado comercializado por Alco Chemical, 95% de sólidos                                       |
| Percarbonato          | : | Percarbonato de sodio de fórmula nominal 2Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ·3H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| TAED                  | : | Tetraacetililen-diamina                                                                                   |
| Enzima de detergencia | : | comercializado por Novozymes A/S                                                                          |
| SLF18                 | : | Tensioactivo no iónico comercializado por BASF                                                            |
| Lutensol TO7          | : | Tensioactivo no iónico comercializado por BASF                                                            |
| LF224                 | : | Tensioactivo no iónico comercializado por BASF                                                            |
| Neodol 1-9            | : | Tensioactivo no iónico comercializado por Shell                                                           |
| DPG                   | : | Dipropilenglicol                                                                                          |

En el siguiente ejemplo todos los niveles se expresan en tanto por ciento en peso de la composición (ya sea composición sólida o líquida).

**Ejemplo 3**

Las composiciones detergentes para lavavajillas tabuladas a continuación se han introducido en una bolsa multicompartimental que tiene un primer compartimento que comprende la composición detergente para lavavajillas sólida (en forma de polvo) y un compartimento líquido superpuesto sobre el compartimento de polvo que comprende las composiciones detergentes para lavavajillas líquidas. La película usada es la película Monosol M8630 suministrada por Monosol. El peso de la composición sólida es de 17 gramos y el peso de las composiciones líquidas es 2,6 gramos.

La bolsa comprende 0,5 - 2 mg de proteasa activa por gramo de composición detergente para lavavajillas. Dicha proteasa es una proteasa variante de una proteasa precursora, siendo la secuencia de dicha proteasa precursora al menos 97%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:1, comprendiendo dicha proteasa variante de dicha proteasa precursora una de las siguientes series de mutaciones con respecto a dicha proteasa precursora:

(i) N76D + S87R + G118R + S128L + P129Q + S130A, con la condición de que dicha proteasa variante no comprenda la serie de mutaciones S188D + N248R;

(ii) N76D + S87R + G118R + S128L + P129Q + S130A + S188D + V244R;

| <u>Formulación</u>                                        | 1                 | 2                 | 3                 | 4                 |
|-----------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Ingrediente                                               | Nivel (% en peso) | Nivel (% en peso) | Nivel (% en peso) | Nivel (% en peso) |
| <u>Composición detergente para lavavajillas sólida</u>    |                   |                   |                   |                   |
| STPP                                                      | 35                | 0                 | 0                 | 56                |
| Carbonato                                                 | 24                | 45                | 40                | 18,5              |
| Ácido metilglucindiacético (83% de sustancia activa)      | 0                 | 15                | 20                | 0                 |
| Silicato                                                  | 7                 | 7                 | 7                 | 1,5               |
| TAED                                                      | 0,5               | 0,5               | 0,5               | 3,8               |
| Carbonato de cinc                                         | 0,5               | 0,5               | 0,5               | 0                 |
| SLF18                                                     | 1,5               | 1,5               | 1,5               | 0                 |
| Plurafac LF224                                            |                   |                   |                   | 0,6               |
| Nitrato de pentaaminoacetato-cobalto (III) (1% activo)    | 0,5               | 0,5               | 0,5               | 0,6               |
| Percarbonato                                              | 15                | 15                | 15                | 11                |
| Polímero sulfonado <sup>2</sup>                           | 10                | 4                 | 3                 | 5,1               |
| Amilasa (14,4 mg/g de sustancia activa) <sup>1</sup>      | 1,3               | 1,8               | 1,5               | 0,7               |
| Coadyuvantes del proceso, perfume y sulfato sódico        | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  |
| <u>Composición detergente para lavavajillas líquida</u>   |                   |                   |                   |                   |
| DPG                                                       | 45                | 45                | 45                | 25                |
| SLF18                                                     | 45                | 45                | 45                | 0                 |
| Neodol 1-9                                                | 3                 | 3                 | 3                 | 2,6               |
| Lutensol TO7                                              |                   |                   |                   | 30                |
| Plurafac LF224                                            |                   |                   |                   | 32,4              |
| Óxido de amina                                            |                   |                   |                   | 3,6               |
| Glicerina                                                 | 2                 | 2                 | 2                 | 4                 |
| Coadyuvantes del proceso y tintes                         | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  |
| Segunda composición detergente para lavavajillas líquida* |                   |                   |                   |                   |
| Lutensol TO7                                              |                   |                   |                   | 65                |
| LF224                                                     |                   |                   |                   | 32                |
| Coadyuvantes del proceso, tintes y glicerina              | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  | Hasta equilibrio  |

\* Si hay presente una segunda composición detergente para lavavajillas líquida, está como parte de una dosis unitaria en 3 compartimentos (uno de polvo y dos líquidos)

<sup>1</sup> Las amilasa adecuadas se pueden comprar a Novozymes, *por ejemplo*, la amilasa comercializada con el nombre comercial Stainzyme Plus® o de Genencor, comercializada con el nombre comercial Powerase®.

5 <sup>2</sup> Los polímeros sulfonados adecuados se pueden comprar a Akzo Nobel, p. ej., Acusol 240-D o Acusol 588G.

La bolsa ilustrada se usa para lavar una carga manchada como se describe más adelante en la presente memoria con las condiciones descritas más adelante en la presente memoria. Los artículos lavados presentan un excelente brillo.

#### 10 Substratos/Suciedad

- Plato con huevo en bandeja honda para el horno Corningware.

o 1 porción de mantequilla con 50 cc de huevo en el microondas 4 ½ minutos.

15

o 2 bandejas hondas para el horno por ciclo

- Olla de acero inoxidable

20

o Pintada con 10 gramos de macarrones con queso Kraft cocinados y mezclados

o Horneada durante siete minutos

o 2 ollas de acero inoxidable por ciclo

25

- Bandeja Vertex de cerámica
  - o Pintada con cinco gramos de arroz Minute Rice cocinado y mezclado
  - o Dejar secar durante la noche
  - o 2 bandejas por ciclo
- Bandejas de cerámica negra
  - o Pintadas con 5 gramos de una suciedad mezclada (TMD) que comprende huevos, verduras, carne, y cereales.
  - o Dejar secar durante la noche
  - o 4 bandejas por ciclo
    - La suciedad TMD fue fabricada por J&R.
- Espátulas de acero inoxidable
  - o Pintadas con cinco gramos de suciedad TMD
  - o Dejar secar durante la noche
  - o 4 espátulas por ciclo

Condiciones del ensayo:

- Banco de cuatro máquinas GE2600
- Agua corriente (0,1 g/l (8 gpg))
- Cuatro productos
- 120 °F Temperatura de entrada del agua
- Ciclo normal/ciclo caliente
- Los sustratos citados anteriormente se colocan en el lavavajillas
- Se añaden 50 gramos de la suciedad TMD al abrir el recipiente del lavado principal

Las dimensiones y valores descritos en la presente memoria no deben tomarse como una limitación estricta a los valores numéricos exactos citados. De hecho, salvo que se indique lo contrario, se pretende que cada una de tales magnitudes, signifiquen el valor mencionado y un intervalo funcionalmente equivalente que rodea ese valor. Por ejemplo, una magnitud descrita como “40 mm” significa “aproximadamente 40 mm”.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Procter & Gamble

<120> COMPOSICIÓN DETERGENTE PARA LAVAVAJILLAS

<130> 11688L

5 <160> 2

<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

10 <213> Bacillus lentus

<400> 1

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
1 5 10 15

15 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
50 55 60

20 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
85 90 95

25 Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
130 135 140

30 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser  
145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
165 170 175

35 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile  
180 185 190

|    |                                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Val                              | Ala | Pro | Gly | Val | Asn | Val | Gln | Ser | Thr | Tyr | Pro | Gly | Ser | Thr | Tyr |
|    |                                  |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
|    | Ala                              | Ser | Leu | Asn | Gly | Thr | Ser | Met | Ala | Thr | Pro | His | Val | Ala | Gly | Ala |
|    | 210                              |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| 5  | Ala                              | Ala | Leu | Val | Lys | Gln | Lys | Asn | Pro | Ser | Trp | Ser | Asn | Val | Gln | Ile |
|    | 225                              |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
|    | Arg                              | Asn | His | Leu | Lys | Asn | Thr | Ala | Thr | Ser | Leu | Gly | Ser | Thr | Asn | Leu |
|    |                                  |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| 10 | Tyr                              | Gly | Ser | Gly | Leu | Val | Asn | Ala | Glu | Ala | Ala | Thr | Arg |     |     |     |
|    |                                  |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <210> 2                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> 275                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <212> PRT                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> Bacillus amyloliquefaciens |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 15 | <400> 2                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | Ala                              | Gln | Ser | Val | Pro | Tyr | Gly | Val | Ser | Gln | Ile | Lys | Ala | Pro | Ala | Leu |
|    | 1                                |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    | His                              | Ser | Gln | Gly | Tyr | Thr | Gly | Ser | Asn | Val | Lys | Val | Ala | Val | Ile | Asp |
|    |                                  |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 20 | Ser                              | Gly | Ile | Asp | Ser | Ser | His | Pro | Asp | Leu | Lys | Val | Ala | Gly | Gly | Ala |
|    |                                  |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|    | Ser                              | Met | Val | Pro | Ser | Glu | Thr | Asn | Pro | Phe | Gln | Asp | Asn | Asn | Ser | His |
|    | 50                               |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| 25 | Gly                              | Thr | His | Val | Ala | Gly | Thr | Val | Ala | Ala | Leu | Asn | Asn | Ser | Ile | Gly |
|    | 65                               |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
|    | Val                              | Leu | Gly | Val | Ala | Pro | Ser | Ala | Ser | Leu | Tyr | Ala | Val | Lys | Val | Leu |
|    |                                  |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|    | Gly                              | Ala | Asp | Gly | Ser | Gly | Gln | Tyr | Ser | Trp | Ile | Ile | Asn | Gly | Ile | Glu |
|    |                                  |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| 30 | Trp                              | Ala | Ile | Ala | Asn | Asn | Met | Asp | Val | Ile | Asn | Met | Ser | Leu | Gly | Gly |
|    |                                  |     | 115 |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
|    | Pro                              | Ser | Gly | Ser | Ala | Ala | Leu | Lys | Ala | Ala | Val | Asp | Lys | Ala | Val | Ala |
|    |                                  | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| 35 | Ser                              | Gly | Val | Val | Val | Val | Ala | Ala | Ala | Gly | Asn | Glu | Gly | Thr | Ser | Gly |
|    | 145                              |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Ser | Ser | Ser | Thr | Val | Gly | Tyr | Pro | Gly | Lys | Tyr | Pro | Ser | Val | Ile | Ala |  |
|    |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
|    | Val | Gly | Ala | Val | Asp | Ser | Ser | Asn | Gln | Arg | Ala | Ser | Phe | Ser | Ser | Val |  |
|    |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| 5  | Gly | Pro | Glu | Leu | Asp | Val | Met | Ala | Pro | Gly | Val | Ser | Ile | Gln | Ser | Thr |  |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
|    | Leu | Pro | Gly | Asn | Lys | Tyr | Gly | Ala | Tyr | Asn | Gly | Thr | Ser | Met | Ala | Ser |  |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
|    | Pro | His | Val | Ala | Gly | Ala | Ala | Ala | Leu | Ile | Leu | Ser | Lys | His | Pro | Asn |  |
| 10 | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
|    | Trp | Thr | Asn | Thr | Gln | Val | Arg | Ser | Ser | Leu | Glu | Asn | Thr | Thr | Thr | Lys |  |
|    |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
|    | Leu | Gly | Asp | Ser | Phe | Tyr | Tyr | Gly | Lys | Gly | Leu | Ile | Asn | Val | Gln | Ala |  |
|    |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| 15 | Ala | Ala | Gln |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    |     |     | 275 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

# REIVINDICACIONES

- 1 Una composición detergente para lavavajillas que comprende una proteasa variante de una proteasa precursora, siendo dicha secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:1, consistiendo dicha proteasa variante de dichas mutaciones de la proteasa precursora en una de las siguientes series de mutaciones con respecto a dicha proteasa precursora:  
5  
(i) N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A;  
10  
(ii) N74D + S85R + G116R + S126L + P127Q + S128A + S182D + V238R;  
y un aditivo reforzante de la detergencia.
- 15 2 La composición detergente para lavavajillas según la reivindicación 1 en donde el aditivo reforzante de la detergencia comprende un agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato o de tipo no fosfato y en donde el agente reforzante de la detergencia de tipo no fosfato se selecciona de MGDA (ácido metilglicindiácético); GLDA (ácido glutámico-N,N-diacético), IDS (ácido iminodisuccínico), sales de carboximetilululina y derivados de los mismos y una mezcla de los mismos.
- 20 3 La composición detergente para lavavajillas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende además un polímero sulfonado.
- 4 La composición detergente para lavavajillas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un coadyuvante de secado.  
25
- 5 La composición detergente para lavavajillas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una enzima amilasa.
- 6 La composición detergente para lavavajillas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una enzima celulasa.  
30
- 7 La composición detergente para lavavajillas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el nivel de proteasa es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5 mg de proteasa activa por gramo de composición.  
35
- 8 La composición detergente para lavavajillas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es en forma de dosis unitaria y en donde el peso de la composición es de aproximadamente 10 gramos a aproximadamente 25 gramos.
- 40 9 Un elemento de dosificación de detergente para lavavajillas para usar en un dispositivo autosifificador, comprendiendo el elemento de dosificación una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 10 Un método de lavado de vajillas en un lavavajillas utilizando una composición detergente para lavavajillas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa de colocar la composición detergente para lavavajillas en un dispensador de producto o en un dispositivo dispensador autosifificador y liberarlo durante el ciclo de lavado principal.  
45

|              |     |             |              |            |             |                         |
|--------------|-----|-------------|--------------|------------|-------------|-------------------------|
| GG36         | 1   | AQSVPWGISR  | VQAPAAHNRRG  | LTGSGVKVAV | LDTGIS-THP  | DLNIRGGASF              |
| VPGEPT-QD    |     |             |              |            |             |                         |
| BPN'         | 1   | AQSVPYGVSSQ | IKAPALHSQG   | YTGSNVKVAV | IDSGIDSSH   | DLKVAGGASM              |
| VPSETNPFD    |     |             |              |            |             |                         |
| PX3          | 1   | AQSVPWGISR  | VQAPAAHNRRG  | LTGSGVKVAV | LDTGIS-THP  | DLNIRGGASF              |
| VPGEPT-QD    |     |             |              |            |             |                         |
| PX4          | 1   | AQSVPWGISR  | VQAPAAHNRRG  | LTGSGVKVAV | LDTGIS-THP  | DLNIRGGASF              |
| VPGEPT-QD    |     |             |              |            |             |                         |
| PX5          | 1   | AQSVPWGISR  | VQAPAAHNRRG  | LTGSGVKVAV | LDTGIS-THP  | DLNIRGGASF              |
| VPGEPT-QD    |     |             |              |            |             |                         |
| Conservación | 1   | *****:::    | ::*** *.:*   | ***.*****  | :::**. : ** | **:: *****: **. * . . . |
| **           |     |             |              |            |             |                         |
| GG36         | 59  | GNGHGTHVAG  | TIAALNNSIG   | VLGVAPSAL  | YAVKVLGASG  | SGSVSSIAQG              |
| LEWAGNNMGH   |     |             |              |            |             |                         |
| BPN'         | 61  | NNSHGTHVAG  | TVAALNNSIG   | VLGVAPSASL | YAVKVLGADG  | SGQYSWIING              |
| IWAIANMMD    |     |             |              |            |             |                         |
| PX3          | 59  | GNGHGTHVAG  | TIAALDNSIG   | VLGVAPRAEL | YAVKVLGASG  | SGSVSSIAQG              |
| LEWAGNNRMH   |     |             |              |            |             |                         |
| PX4          | 59  | GNGHGTHVAG  | TIAALDNSIG   | VLGVAPRAEL | YAVKVLGASG  | SGSVSSIAQG              |
| LEWAGNNRMH   |     |             |              |            |             |                         |
| PX5          | 59  | GNGHGTHVAG  | TIAALDNSIG   | VLGVAPRAEL | YAVKVLGASG  | SGSVSSIAQG              |
| LEWAGNNRMH   |     |             |              |            |             |                         |
| Conservación | 61  | . *.*****   | *.:***:****  | ***** *    | *****.*     | ** . * * : * : *** *    |
| *            |     |             |              |            |             |                         |
| GG36         | 119 | VANLSLGSPS  | PSATLEQAVN   | SATSRGVLVV | AASGNSGAGS  | ----ISYPAR              |
| YANAMAVGAT   |     |             |              |            |             |                         |
| BPN'         | 121 | VINMSLGGPS  | GSAALKAAVD   | KAVASGVVVV | AAAGNEGTS   | SSSTVGYPGK              |
| YPSVIAVGAV   |     |             |              |            |             |                         |
| PX3          | 119 | VANLSLGLQA  | PSATLEQAVN   | SATSRGVLVV | AASGNSGAGS  | ----ISYPAR              |
| YANAMAVGAT   |     |             |              |            |             |                         |
| PX4          | 119 | VANLSLGLQA  | PSATLEQAVN   | SATSRGVLVV | AASGNSGAGS  | ----ISYPAR              |
| YANAMAVGAT   |     |             |              |            |             |                         |
| PX5          | 119 | VANLSLGLQA  | PSATLEQAVN   | SATSRGVLVV | AASGNSGAGS  | ----ISYPAR              |
| YANAMAVGAT   |     |             |              |            |             |                         |
| Conservación | 121 | * *:*** :   | *:**: **: *  | *,,: **:** | **:**.**:.. | :.***:                  |
| *...:****.   |     |             |              |            |             |                         |
| GG36         | 175 | DQNNNRASF   | QYGAGLDIVA   | PGVNVQSTYP | GSTYASLNGT  | SMATPHVAGA              |
| AALVKQKNPS   |     |             |              |            |             |                         |
| BPN'         | 181 | DSSNQRASFS  | QYGPELDVMA   | PGVSIQSTLP | GNKYGAYNGT  | SMASPHVAGA              |
| AALILSKHPN   |     |             |              |            |             |                         |
| PX3          | 175 | DQNNNRADF   | QYGAGLDIVA   | PGVNVQSTYP | GSTYASLNGT  | SMATPHVAGA              |
| AALVKQKNPS   |     |             |              |            |             |                         |
| PX4          | 175 | DQNNNRASF   | QYGAGLDIVA   | PGVNVQSTYP | GSTYASLNGT  | SMATPHVAGA              |
| AALVKQKNPS   |     |             |              |            |             |                         |
| PX5          | 175 | DQNNNRADF   | QYGAGLDIVA   | PGVNVQSTYP | GSTYASLNGT  | SMATPHVAGA              |
| AALVKQKNPS   |     |             |              |            |             |                         |
| Conservación | 181 | *..*:**. ** | ***. **:*: * | ***.:*** * | *..*.: ***  | ***:***** ***:          |
| *.*.         |     |             |              |            |             |                         |
| GG36         | 235 | WSNVQIRNHL  | KNTATSLGST   | NLYGSGLVNA | EAAATR      |                         |
| BPN'         | 241 | WTNTQVRSSL  | ENTTTKLGD    | FYYGKGLINV | QAAAQ       |                         |
| PX3          | 235 | WSNVQIRRHL  | KNTATSLGST   | NLYGSGLVNA | EAAATR      |                         |
| PX4          | 235 | WSNVQIRNHL  | KNTATSLGST   | NLYGSGLVNA | EAAATR      |                         |
| PX5          | 235 | WSNVQIRNHL  | KNTATSLGST   | NLYGSGLVNA | EAAATR      |                         |
| Conservación | 241 | *.* ** *    | :**:.***:    | **.*.*.    | :***:       |                         |

Fig. 1

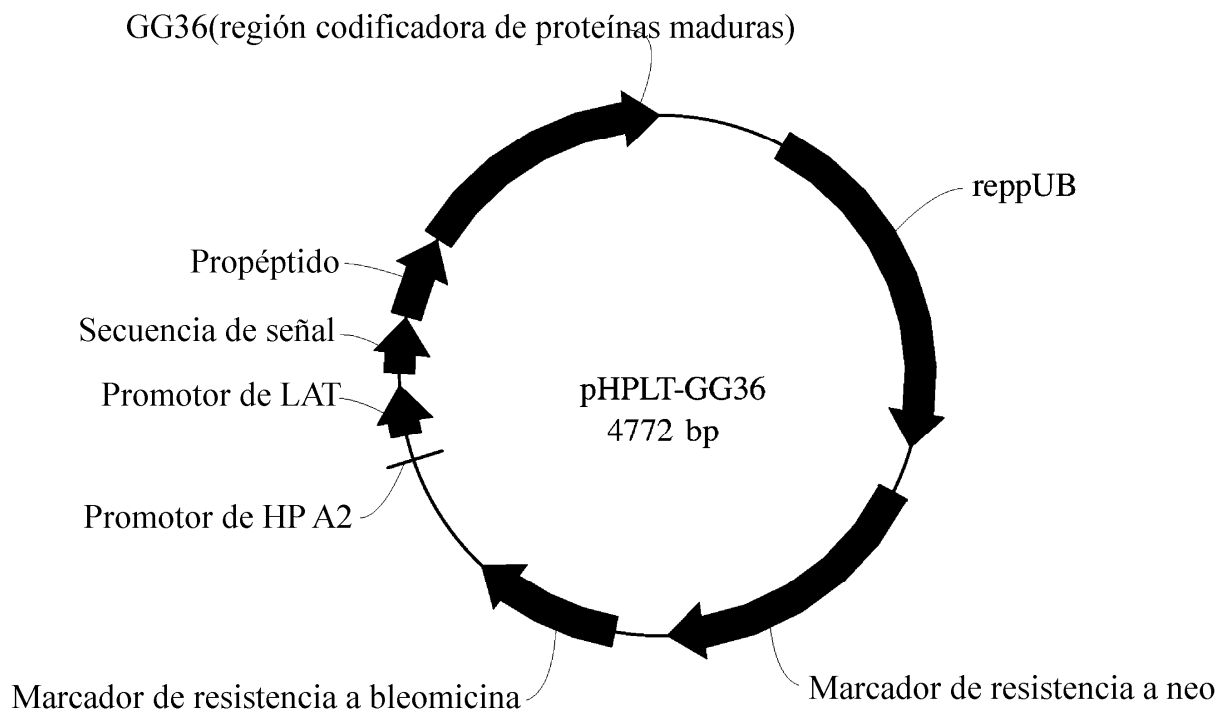


Fig. 2