

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 553**

51 Int. Cl.:

C11D 1/06 (2006.01)

C11D 1/37 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C11D 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2011 E 11728878 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2596087**

54 Título: **Combinaciones de ramnolípidos y enzimas para una limpieza mejorada**

30 Prioridad:

22.07.2010 EP 10170403

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

26.02.2016

73 Titular/es:

UNILEVER N.V. (100.0%)

Weena 455

3013 AL Rotterdam, NL

72 Inventor/es:

PARRY, ALYN JAMES;

PARRY, NEIL JAMES;

PEILOW, ANNE CYNTHIA y

STEVENSON, PAUL SIMON

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 561 553 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

Combinaciones de ramnolípidos y enzimas para una limpieza mejorada

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a composiciones de limpieza que comprenden mono-ramnolípidos en combinación con enzimas.

Antecedentes

10 Los ramnolípidos son una clase de glicolípidos. Están contruidos de ramnosa combinada con ácidos grasos beta hidroxilados. La ramnosa es un azúcar. Los ácidos grasos son omnipresentes en animales y plantas. El extremo carboxilo del extremo del ácido graso está conectado a la ramnosa. Los ramnolípidos son compuestos de sólo tres elementos comunes; carbono, hidrógeno y oxígeno. Son un ácido cristalino. Los ramnolípidos pueden ser producidos por cepas de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Hay dos grupos principales de ramnolípidos; mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos.

15 Los mono-ramnolípidos tienen un único anillo de azúcar ramnosa. Un mono-ramnolípido típico producido por *P. aeruginosa* es L-ramnosil-β-hidroxidecanoil- β-hidroxidecanoato (RhaC₁₀C₁₀). Puede hacerse referencia al mismo como Rha-C₁₀-C₁₀, con una fórmula de C₂₆H₄₈O₉. Los mono-ramnolípidos tienen un único anillo de azúcar ramnosa. La denominación IUPAC es ácido 3-[3-[(2R, 3R, 4R, 5R, 6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan- 2-il]oxidecanoiloxi] decanoico.

Los di-ramnolípidos tienen dos anillos de azúcar de ramnosa. Un di-ramnolípido típico es L-ramnosil-L-ramnosil-β-hidroxidecanoil- β-hidroxidecanoato (Rha₂C₁₀C₁₀). Puede hacerse referencia al mismo como Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, con una fórmula de C₃₂H₅₈O₁₃. La denominación IUPAC es ácido 3-[3-[4,5-dihidroxi-6-metil-3-(3, 4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il)oxioxan-2-il]oxidecanoiloxi]decanoico.

20 En la práctica, existen una diversidad de otros componentes menores con diferentes combinaciones de longitudes de cadena alquílica, dependiendo de la fuente de carbono y la cepa bacteriana, en combinación con los ramnolípidos más comunes indicados anteriormente. La relación de mono-ramnolípido a di-ramnolípido puede ser controlada mediante el procedimiento de producción. Algunas bacterias solo producen mono-ramnolípido, véase el documento US5767090: Ejemplo 1, algunas enzimas pueden convertir los mono ramnolípidos en di-ramnolípidos.

25 En diversas publicaciones, los mono-ramnolípidos tienen la notación Rha-, que puede abreviarse como Rh o RL2. De manera similar, los di-ramnolípidos tienen la notación Rha-Rha o Rh-Rh- o RL1. Por razones históricas, el "ramnolípido 2" es un mono ramnolípido y el "ramnolípido 1" es un di-ramnolípido. Esto conduce a cierta ambigüedad en el uso de "RL1" y "RL2" en la literatura. A lo largo de la presente memoria descriptiva de patente, los presentes inventores usan los términos mono- y di-ramnolípido con el fin de evitar esta posible confusión. Sin embargo, si se usan abreviaturas, R1 es mono-ramnolípido y R2 es di-ramnolípido. Para más información acerca de la confusión de la terminología en la técnica anterior, véase la introducción del documento US 4814272.

30 Los ramnolípidos siguientes se han detectado como producidos por las bacterias siguientes: (C12:1, C14:1 indica cadenas acilo graso con dobles enlaces).

Los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* (mono-ramnolípidos):

35 Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-O₁₀-O₁₂, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₂-C₁₀, Rha-C_{12:1}-C₁₀

Los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* (di-ramnolípidos):

Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₈-C_{12:1}, Rha-Rha-C₁₀-C₈, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-Rha-C₁₂-C₁₀, Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₂, Rha-Rha-C₁₀-C_{14:1}

Los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* (sin identificar como mono- o di-ramnolípidos):

40 C₈-C₈, C₈-C₁₀, C₁₀-C₈, C₈-C_{12:1}, C_{12:1}-C₈, C₁₀-C₁₀, C₁₂-C₁₀, C_{12:1}-C₁₀, C₁₂-C₁₂, C_{12:1}-C₁₂, C₁₄-C₁₀, C_{14:1}-C₁₀, C₁₄-C₁₄.

Los ramnolípidos producidos por *P. chlororaphis* (solo mono-ramnolípidos):

Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₂-C₁₀, Rha-C_{12:1}-C₁₀, Rha-C₁₂-C₁₂, Rha-C_{12:1}-C₁₂, Rha-C₁₄-C₁₀, Rha-C_{14:1}-C₁₀.

Los ramnolípidos producidos por *Burkholdera pseudomallei* (sólo di-ramnolípidos):

Rha-Rha-C₁₄-C₁₄.

45 Los ramnolípidos producidos por *Burkholdera (Pseudomonas) plantarii* (sólo di-ramnolípidos):

Rha-Rha-C₁₄-C₁₄.

Debido a que los ramnolípidos se producen en diversas fórmulas químicas, cada una con un HLB diferente, se sabe que ramnolípidos pueden producirse o mezclarse para tener una gama de propiedades espumantes. Los ramnolípidos son un tensoactivo aniónico con un extremo hidrófilo y un extremo lipófilo. Cuando su concentración aumenta a un cierto nivel, se sabe que los ramnolípidos se unen entre sí dentro de un líquido en una micela.

Se ha sugerido que los ramnolípidos con dos ácidos grasos más cortos son más activos en la reducción de la tensión superficial y como emulsionante. Los ramnolípidos raros con una única cadena de ácido graso no son tan eficaces.

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra naturalmente en suelos, en agua y en plantas. Metabólicamente, *P. aeruginosa* es quimioheterotrófica, generalmente aeróbica, y utiliza una amplia gama de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y nitrógeno.

Hay más de 100 cepas de *P. aeruginosa* en los archivos de la American Type Culture Collection (ATCC). También hay un número de cepas que sólo están disponibles a los fabricantes de ramnolípidos comerciales. Además, probablemente hay miles de cepas aisladas por diversas instituciones de investigación en todo el mundo. Se ha realizado cierto trabajo clasificándolas en grupos. Cada cepa tiene características diferentes, incluyendo la cantidad de ramnolípido producida, que tipos de ramnolípidos se producen, lo que metaboliza y las condiciones en las que crece. Sólo se ha estudiado ampliamente un pequeño porcentaje de las cepas.

Mediante evaluación y selección, las cepas de *P. aeruginosa* pueden ser aisladas para producir ramnolípidos en concentraciones más altas y de manera más eficiente. Las cepas pueden ser seleccionadas también para producir menos subproducto y para metabolizar diferente materia prima o contaminantes. Esta producción se ve muy afectada por el entorno en el que se cultiva la bacteria.

Varios documentos han propuesto el uso de ramnolípidos en composiciones detergentes. El documento US 2004/0152613 A1 (Ecover), también EP1445302, describe composiciones que incluyen aquellas que tienen mezclas de tensoactivos de ramnolípidos y tensoactivos convencionales sintéticos. En el Ejemplo 5, el sistema tensoactivo se ensayó añadiéndolo a un polvo base de lavado de ropa convencional que comprendía adyuvante de zeolita, pero no enzimas.

El documento US 5417879 A1 (Unilever) sugiere una composición mixta de glicolípido micelar y tensoactivo laminar, que puede ser glicolípido o no. Se proponen composiciones para su uso a entre 0,5 y 50 g/l. Los ejemplos que usaban ramnolípido no usaban ninguna enzima. En la columna 12, líneas 24 a 25, se menciona como una posibilidad la combinación de los biotensoactivos con una cantidad no divulgada de enzima. Para llegar a una combinación de enzima con ramnolípido es necesario hacer diversas selecciones del presente documento.

El documento US2006106120 describe una mezcla de micro-organismo, biotensoactivo y una enzima degradante de plástico para la biorremediación de materiales fabricados por el hombre. El biotensoactivo puede ser un ramnolípido (párrafo 62). La enzima puede ser una lipasa (párrafo 64). No se da preferencia a ningún componente del ramnolípido. No se ejemplifican ni ramnolípidos ni lipasas y no se reivindican específicamente ramnolípidos.

El documento US2004072713A (Unilever) divulga un artículo para su uso en un procedimiento enzimático de limpieza de tejidos, en el que dicho artículo contiene uno o más tipos de microorganismos inoos capaces de excretar enzimas útiles en dicho procedimiento de limpieza de tejidos. Es especialmente útil si, además de enzimas, los microorganismos son capaces también de producir otras entidades químicas que contribuyen al procedimiento de limpieza, por ejemplo, biotensoactivos, por ejemplo, lipopolisacáridos tal como se describe en el documento EP924221. Estos biotensoactivos no son ramnolípidos. De hecho, los niveles de biotensoactivos generados eran muy bajos y ciertamente no superarían 0,5 g/l. Se afirma que los microorganismos son capaces de producir y secretar enzimas útiles en el lavado, tales como oxidoreductasas, carbohidrasas, proteasas, lipasas, transferasas y glicosidasas.

La capacidad de los microbios para co-generar enzima y biotensoactivos se divulga en "Lipase and biosurfactant production for utilisation in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbon". Martins VG et al (2008) Quimica Nova N° 31 vol 8, 1942-1947, y en "Isolation and characterisation of a lipid degrading bacterium and its application to lipid containing wastewater treatment", Matsumiya Y. et al (2007) Journal of Bioscience and Bioengineering N° 103, Vol 4, 325-330.

El documento US2006080785A (Nero) describe la limpieza de alfombras mediante la aplicación a la alfombra de una composición de limpieza que tiene biotensoactivos y enzimas; y el capó de limpiar el material. Las enzimas derivadas de algas marinas no se especifican adicionalmente. Se mencionan ramnolípidos de composición desconocida, pero no se proporcionan ejemplos.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona una composición detergente con una novedosa relación de mono a di ramnolípidos en combinación con lipasa. La cantidad de mono-ramnolípido presente es mayor que la cantidad de di-ramnolípido presente (si existe). Preferentemente, al menos el 80% en peso, más preferentemente al menos el 90% en peso o incluso el 100% en peso del ramnolípido en la composición es mono-ramnolípido.

Preferentemente, la lipasa se deriva de fuentes fúngicas o bacterianas. Dentro de las fuentes bacterianas, se incluye la expresión de otros microbios, tales como levadura, de genes que han sido clonados de bacterias.

El ramnolípido está presente preferentemente en una cantidad del 0,5 al 40% en peso. La lipasa está presente preferentemente en una cantidad del 0,0001 al 5% en peso.

La composición detergente es preferentemente no construida. Es decir, los formadores de zeolita, de fosfato o de silicato están ausentes.

La composición detergente es preferentemente una composición detergente líquida y si hay presente un adyuvante de ácido cítrico, está limitado a un nivel máximo del 2% en peso. La composición es especialmente útil como un detergente de lavado de ropa y puede ser usada ventajosamente para el lavado con agua con una dureza de agua inferior de menos de 15°F. Un procedimiento mediante el cual la ropa y la composición se lavan en agua ablandada previamente se usa ventajosamente, de manera particular, con las composiciones de la invención.

Las composiciones se usan para eliminar suciedades de grasa de la colada, especialmente de telas de algodón. La eliminación de suciedades del algodón es una preocupación creciente ya que muchas de las sofisticadas tecnologías de eliminación de suciedades y liberación de suciedades incluidas en los detergentes de lavado de ropa modernos funcionan mejor en telas de poliéster. Por consiguiente, es ventajoso combinar el sistema detergente de la presente invención con un polímero de liberación de suciedades de poliéster.

El uso de mono-ramnolípidos y lipasa en una composición detergente según la invención conduce a beneficios de limpieza mejorados y posiblemente a sinergias con los tensioactivos aniónicos sintéticos, por ejemplo tensioactivo aniónico sintético de benceno sulfonato de alquilo C12-14. Este tensioactivo se emplea comúnmente en las composiciones de detergente de lavado de ropa y se usa típicamente con un tensioactivo no iónico, tal como el tensioactivo no iónico etoxilado usado en el documento US5417879. Por razones medioambientales, es deseable eliminar este tensioactivo no iónico de la composición. Los ramnolípidos con la relación mono a di ramnolípidos reivindicada proporcionan un sustituto adecuado para el componente tensioactivo no iónico, especialmente cuando se usan para eliminar suciedades de grasa y particularmente cuando se usan para eliminar suciedades de telas de algodón. Las composiciones son adecuadas para temperaturas de lavado bajas y tiempos de lavado cortos, lo que ayuda al ahorro de energía y de tiempo.

Una suciedad de grasa preferente es grasa de vacuno.

Descripción detallada de la invención

Una gran proporción de biotensioactivos son generados por la acción de bacterias sobre materias primas renovables y son opciones cada vez más y más viables como reemplazos sostenibles de los tensioactivos sintéticos actuales. Dentro de la cartera actual de biotensioactivos comercializados actualmente, los ramnolípidos, formados por la degradación de aceites y grasas por *Pseudomonas Aeg* muestran pobres beneficios de limpieza cuando se usan a las concentraciones de los componentes generados por el procedimiento de descomposición bacteriana. Sin embargo, cuando los componentes mono y di ramnolípido de los ramnolípidos expresados se extraen y el mono-ramnolípido se usa con lipasa, se obtienen resultados de limpieza superiores. Además, mediante la producción de mezclas y el mezclado con tensioactivos aniónicos sintéticos pueden obtenerse mejoras de detergencia adicionales.

La composición detergente puede comprender otros ingredientes que se encuentran comúnmente en los líquidos de lavado de ropa. Especialmente, polímeros de liberación de suciedad con poliéster sustancial, hidrótopos, opacificantes, colorantes, perfumes, otras enzimas, otros tensioactivos, microcápsulas de ingredientes tales como perfumes o aditivos para el cuidado, suavizantes, polímeros para la lucha contra la redeposición de la suciedad, blanqueador, activadores de blanqueo y catalizadores de blanqueo, antioxidantes, agentes de control de pH y tampones, espesantes, estructurantes externos para modificación de la reología, señales visuales, con o sin ingredientes funcionales embebidos en las mismas y otros ingredientes conocidos por las personas con conocimientos en la materia. Preferentemente, la composición es un líquido y de manera ventajosa se envasa en una botella multidosis o en una bolsita soluble de dosis unitaria.

Enzimas

Las lipasas adecuadas para su uso en las composiciones de la invención incluyen las de origen bacteriano, fúngico o de

levaduras. Se incluyen los mutantes artificiales modificados químicamente o con proteínas creadas genéticamente. Los ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) tal como se describe en los documentos EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* tal como se describe en el documento WO 96/13580, una lipasa *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. Pseudomonas* (EP 218 272),
 5 *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (de Dartois et al. (1993), *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131, 253-360), *B. stearrowthermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en los documentos WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, US2008004186, US2006205628, US5869438, US6017866, US2002110854, US6939702, US2009221034, US200802425, US2004053360, US2005281912, US2006075518, US2005059130, US20041542180, US2003199069, WO98106215 y WO08088489.

Otros ejemplos de lipasas adecuadas se describen y se hace referencia a las mismas, pero sin limitarse a, las que se describen por Juardo et al *J Surfact Deterg* (2007) 10: 61-70, Horchani et al *J Molecular Catalysis: Enzymatic* 56 (2009) 237-245, Aloulou et al *Biochimica et Biophysica acta* 1771 (2007) 1446-1456, Mogensen et al *Biochemistry* (2005) 44: 1719-1730, Nicanuzia dos Prazeres et al *Brazilian J of Microbiology* (2006) 37: 505-509, Fernandez-Lorente et al *Biotechnology and Bioengineering*, 97: vol 2 242-250, Gilbert (1993) *Enzyme Microb. Technol.* Vol 15 634-645, Bora y Kalita (2008) *J of Chemical Technology and Biotechnology* 83: 688-693, Liu et al (2009) *Biochemical Engineering Journal* 46: 265-270, Thirunavukarasu et al (2008) *Process Biochemistry* 43: 701-706, Saisubramanian et al (2008) *Appl Biochem Biotechnol* 150:139-156, Joshi and Vinay (2007) *Res J Biotech* vol2 no2 50-56. Las lipasas de levadura tales como las de *Candida* sp y *Cryptococcus* sp son adecuadas.

Las enzimas lipasas preferentes disponibles comercialmente incluyen Lipolase™ y Lipolase Ultra™, Lipex™, Novozym 525L (Novozymes A/S).

La composición puede comprender una cutinasa, clasificada en CE 3.1.1.74. La cutinasa usada según la invención puede ser de cualquier origen. Preferentemente, las cutinasas son de origen microbiano, en particular de origen bacteriano, fúngico o de levadura.

Las cutinasas (esterasas) son enzimas que son capaces de degradar la cutina. En una realización preferente, la cutinasa se deriva de una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus oryzae*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, o *Fusarium roseum sambucium*, una cepa de *Helminthosporium*, en particular *Helminthosporium sativum*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola insolens*, una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas mendocina*, o *Pseudomonas putida*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Streptomyces*, en particular *Streptomyces scabies*, o una cepa de *Ulocladium*, en particular *Ulocladium Consortiale*. En una realización más preferente, la cutinasa se deriva de una cepa de *Humicola insolens*, en particular la cepa *Humicola insolens* DSM 1800. La cutinasa de *Humicola insolens* se describe en el documento WO 96/13580. La cutinasa puede ser una variante, tal como una de las variantes divulgadas en los documentos WO 00/34450 y WO 01/92502, que se incorporan a la presente memoria, por referencia. Las variantes de cutinasa preferentes incluyen las variantes enumeradas en el Ejemplo 2 del documento WO 01/92502, que se incorpora a la presente memoria específicamente, por referencia.

Otras esterasas adecuadas son las descritas en los documentos US2002012959, WO09085743, WO09002480, US2002137177, US2003024009, US2010151542, US2003032161, US2002007518 y US2007167344. Estas incluyen también la clase de enzima transferasa.

Las cutinasas comerciales preferentes incluyen NOVOZYM™ 51032 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

La composición puede comprender también fosfolipasa clasificada como EC 3.1.1.4 y/o EC 3.1.1.32. Tal como se usa en la presente memoria, el término fosfolipasa es una enzima que tiene actividad hacia los fosfolípidos. Los fosfolípidos, tales como lecitina o fosfatidilcolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en unas posiciones exterior (sn-1) y media (sn-2) y esterificado con ácido fosfórico en la tercera posición; el ácido fosfórico, a su vez, puede ser esterificado a un amino-alcohol. Las fosfolipasas son enzimas que participan en la hidrólisis de los fosfolípidos. Pueden distinguirse varios tipos de actividad fosfolipasa, incluyendo las fosfolipasas A₁ y A₂ que hidrolizan un grupo acilo graso (en la posición sn-1 y la posición sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípido; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que puede hidrolizar el grupo acilo graso restante en lisofosfolípido. La fosfolipasa C y la fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacilglicerol o ácido fosfatídico, respectivamente.

El término fosfolipasa incluye enzimas con actividad fosfolipasa, por ejemplo, fosfolipasa A (A₁ o A₂), actividad fosfolipasa B, actividad fosfolipasa C o actividad fosfolipasa D. El término "fosfolipasa A" se usa en la presente memoria con relación a una enzima de la invención destinada a cubrir una enzima con actividad fosfolipasa A₁ y/o fosfolipasa A₂. La actividad

fosfolipasa puede ser proporcionada por enzimas que tienen también otras actividades, tales como, por ejemplo, una lipasa con actividad fosfolipasa. La actividad fosfolipasa puede ser, por ejemplo, de una lipasa con actividad fosfolipasa secundaria. En otras realizaciones de la invención, la actividad de la enzima fosfolipasa es proporcionada por una enzima que tiene esencialmente sólo actividad fosfolipasa y en la que la actividad de la enzima fosfolipasa no es una actividad secundaria.

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

Las fosfolipasas preferentes se derivan de una cepa de *Humicola*, especialmente *Humicola lanuginosa*. La fosfolipasa puede ser una variante, tal como una de las variantes divulgadas en el documento WO 00/32758, que se incorporan a la presente memoria, por referencia. Las variantes de fosfolipasa preferentes incluyen las variantes enumeradas en el Ejemplo 5 del documento WO 00/32758, que se incorpora específicamente a la presente memoria, por referencia. En otra realización preferente, la fosfolipasa es una descrita en el documento WO 04/111216, especialmente las variantes enumeradas en la tabla en el Ejemplo 1.

En otra realización preferente, la fosfolipasa se deriva de una cepa de *Fusarium*, especialmente *Fusarium oxysporum*. La fosfolipasa puede ser una descrita en el documento WO 98/026057 mostrada en la SEQ ID NO: 2 derivada de *Fusarium oxysporum* DSM 2672, o sus variantes.

En una realización preferente de la invención, la fosfolipasa es una fosfolipasa A₁ (CE. 3.1.1.32). En otra realización preferente de la invención, la fosfolipasa es una fosfolipasa A₂ (EC.3.1.1.4.).

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

La composición puede comprender además otras enzimas que potencian la capacidad de detergencia de la composición, tales como agentes suavizantes, una amilasa (por ejemplo, Fungamyl(R) de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), una lipasa (por ejemplo, Novocor(R) AD de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), una celulasa (por ejemplo, Celluzyme(R), Carezyme(R) y/o Celluclast(R), todas ellas de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), una xilanasa (por ejemplo, Biofeed(R) PLUS o Shearzyme(TM) de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), una beta-glucanasa (por ejemplo, Viscozyme(R) o Ultraflo(TM) de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), una pectinasa (por ejemplo, Pectinex(TM) Ultra de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), una peroxidasa (por ejemplo, Guardzyme(TM) de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), una lacasa (por ejemplo, obtenida de *Myceliophthora* o *Polyporus*), un agente potenciador para la peroxidasa/lacasa (por ejemplo, PPT o metilsiringato de ácido metilsiringico o sus derivados) y/o un tampón (por ejemplo, ácido cítrico).

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se examinaron varias composiciones de lipasa y ramnolípido para determinar su capacidad para eliminar una suciedad de carne con color.

Se prepararon soluciones de lavado dispersando la lipasa a una concentración de 4 mg de proteína por litro junto con tensioactivo detergente a la concentración requerida en solución salina tamponada con fosfato (PBS) ajustada para pH 8 y dureza del agua 12° FH. Se mezclaron 10 ml de la solución de lavado en viales de plástico de 25 ml a 37°C con agitación a 200 rpm en un incubador orbital durante 30 minutos. A continuación, se añadieron muestras (aproximadamente 1 cm²) de tela de algodón ensuciadas con grasa de vacuno de color rojo Sudán y los viales se devolvieron a la incubadora con agitación. Las muestras se retiraron a intervalos de tiempo, se enjuagaron en agua fría y se secaron a 37°C. El color

residual se supervisó usando un dispositivo Macbeth Color Eye, y se comparó con las telas ensuciadas no tratadas.

La enzima bacteriana es "Lipomax", una variante M21 L de lipasa derivada de bacterias de *Pseudomonas alcaligenes* tal como se describe en el documento WO 94/25578 de Gist-Brocades (M.M.M.J. Cox, H.B.M. Lenting, L.J.S.M. Mulleners y J.M. van der Laan).

- 5 La enzima fúngica es "Lipolasa", derivada de *Humicola languginosa* tal como se describe en el documento EP 0 258 068 y disponible de Novozymes A S.

Los detalles de los tensioactivos eran los que indican a continuación:

RL = ramnolípido: un biotensioactivo de origen bacteriano. Disponible comercialmente de Jeneil como RBR425 (25% AM). La composición de este material se analizó y se proporciona en la Tabla 3 a continuación.

- 10 Además del ramnolípido suministrado comercialmente, se prepararon otras dos muestras mediante su separación en fracciones ricas en R₁ y R₂. Estas fracciones se usaron también en combinación con las lipasas. Los datos de limpieza durante 1 hora y 4 horas se proporcionan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1 - 1 hora

Ramnolípido	Sin enzima	Enzima bacteriana	Enzima fúngica
0,5 g/l RL	1,15	8,88	1,04
0,5 g/l R1	9,85	11,31	12,25
0,5 g/l R2	0,80	8,87	1,05

15

Tabla 2 - 4 horas

Ramnolípido	Sin enzima	Enzima bacteriana	Enzima fúngica
0,5 g/l RL	1,18	10,68	1,89
0,5 g/l R1	14,52	12,43	14,19
0,5 g/l R2	1,14	11,42	2,85

Tabla 3 - Análisis de JBR425 mediante HPLC/MS

Congéneres ramnolípidos	m/z	%
Di - C10-C8	621	1,6
Di - C8-C10	621	1,3
Di - C10-C10	649	67,4
Di - C10-C12:1	675	0,78
Di - C12:1-C10	675	0,016
Di - C10-C12	677	3,18
Di - C12-C10	677	1,12
Mono - C10-C8	475	0,63

(Cont.)

Mono - C8-C10	475	0,47
Mono - C10-C10	503	21,6
Mono - C10-C12:1	529	0,69
Mono - C12:1-C10	529	0,014
Mono - C10-C12	531	1,12
Mono - C12-C10	531	0,023

5 Para el análisis en la presente invención de este ramnolípido en la Tabla 3, una cantidad conocida de JBR425 se acidificó a pH 3 usando HCl 12M y se colocó en un refrigerador durante la noche. A continuación, el sobrenadante se extrajo tres veces con una mezcla 2:1 de cloroformo y etanol. A continuación, el disolvente se separó mediante evaporación rotatoria y, a continuación, la mezcla de ramnolípido aislada fue re-disuelta en metanol.

10 El procedimiento de separación y de caracterización de la mezcla se llevó a cabo usando una HPLC conectada a un espectrómetro de masas con trampa de iones e ionización de electrospray. El modo de ionización estaba en modo negativo con un alcance de detección de 50-1200Da. La columna usada para la separación era una columna Phenomenex luna C18 de 250 x 4,6mm, de 5 µm. La fase móvil: agua (fase móvil A) y acetonitrilo (fase móvil B) se usaron para separar mediante un gradiente de 60:40 (A:B) cambiando a 30:70 (A:B) durante 30 minutos. A continuación, el sistema se mantuvo durante 5 minutos antes de volver a las condiciones de partida todo ello a un caudal de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl.

REIVINDICACIONES

1. Una composición detergente que comprende ramnolípidos y lipasa, en la que el porcentaje en peso del ramnolípido constituido por mono-ramnolípidos es más del 50% en peso.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el porcentaje en peso del ramnolípido constituido por mono-ramnolípidos es más del 80% en peso.
3. Composición según la reivindicación 1 o 2, en la que el porcentaje en peso del ramnolípido constituido por mono-ramnolípidos es más del 90% en peso.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el 100% en peso del ramnolípido es mono-ramnolípido.
- 10 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ramnolípido está presente en una cantidad del 0,5 al 40% en peso
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la lipasa está presente en una cantidad del 0,0001 al 5% en peso.
- 15 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos el 5% en peso de tensioactivo aniónico sintético.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tensioactivo aniónico sintético comprende alquil benceno sulfonato C12-14 lineal.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene menos del 2% de adyuvante de detergencia.
- 20 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene más tensioactivo aniónico sintético que ramnolípido.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un líquido de lavado de ropa que comprende del 10 al 40% de tensioactivo total.
12. Un líquido de lavado de ropa según la reivindicación 11, que comprende menos o igual al 2% de ácido cítrico.
- 25 13. Una composición de detergente de lavado de ropa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un polímero de liberación de suciedad sustancialmente de poliéster.
14. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el lavado en agua con una dureza de agua inferior de menos de 15°F.
- 30 15. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para eliminar suciedades de grasa de la colada.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que las suciedades de grasa se eliminan de una tela de algodón.
17. Uso según la reivindicación 15 o 16, en el que la suciedad de grasa es grasa de vacuno.
- 35 18. Un procedimiento de limpieza de un sustrato que comprende las etapas de sumergir el sustrato en agua, añadir una composición según las reivindicaciones 1 a 13 al agua para formar una solución de lavado y lavar el sustrato, **caracterizado porque** el tiempo de ciclo de lavado es menor de 60 minutos, preferentemente menor de 30 minutos y la temperatura del agua es menor de 35°C.