

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 023**

51 Int. Cl.:

C11D 1/06 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2011 PCT/EP2011/061210**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12010405**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2011 E 11729310 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2596088**

54 Título: **Composiciones detergentes que comprenden biotensioactivo y enzima**

30 Prioridad:

22.07.2010 EP 10170401

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

18.04.2017

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 2 609 023 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

Composiciones detergentes que comprenden biotensioactivo y enzima

Campo técnico

La presente invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden biotensioactivo y enzima.

5 **Antecedentes**

Una descripción de biotensioactivos se publica por Rahman en *Biotechnology* 7 (2): 360-370, 2008 ISSN 1682-269X "Production, Characterisation and application of Biosurfactants - review"

10 Las enzimas se han usado en formulaciones detergentes como un adyuvante de limpieza durante muchos años. Pueden derivar de fuentes bacterianas o de otras fuentes. Las enzimas más comúnmente empleadas son proteasas, amilasas, mannanasas, lipasas y celulasas. Normalmente derivan de cultivos fúngicos o de levaduras.

15 Las lipasas se usan en formulaciones detergentes que contienen tensioactivos para ayudar a la limpieza de suciedad oleaginosa de los tejidos. A pesar de su aislamiento y caracterización hace algunas décadas, ha sido difícil formular estas enzimas en formulaciones tensioactivas convencionales debido a que hay una competición entre la enzima y el tensioactivo por la suciedad sustrato diana. Los tensioactivos ganarán esta competición por la superficie y competirán o desplazarán enzimas de la superficie oleaginosa y de esta manera reducirán el rendimiento de las enzimas en estas suciedades. De esta manera, el impacto práctico de las lipasas en los productos de limpieza detergentes está limitado, especialmente cuando se compara con el impacto de otras enzimas de limpieza, tales como proteasas y amilasas.

20 El movimiento a químicas más sostenibles refuerza un deseo de reducir el nivel tensioactivo en el lavado. Como una bio alternativa, las enzimas representan una elección eficiente de peso para mantener el rendimiento en la retirada de suciedad oleaginosa mientras se disminuyen los niveles de tensioactivo. Se ha propuesto el uso de biotensioactivos en muchos documentos de la técnica anterior.

Los siguientes documentos se refieren a combinaciones de biotensioactivos y enzimas producidas a partir de bacterias.

25 El documento DE10 2008 038479 A1 (Henkel) desvela mezclas potenciales de enzima alfa amilasa que pueden derivar de bacterias con tensioactivos que pueden ser biotensioactivos y pueden producirse a través de bacterias.

El documento WO2006/031554A2 (Novozymes) desvela como uno de sus ejemplos una mezcla de una proteasa derivada bacteriamente con el tensioactivo surfactina. No parece que haya importancia unida a las enzimas derivadas bacteriamente, la mayoría de las enzimas citadas derivan de hongos.

30 "Lipase and biosurfactant production for utilisation in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbon". Martins VG y col (2008) *Quimica Nova* N.º 31 vol. 8, 1942-1947.

"Isolation and characterisation of a lipid degrading bacterium and its application to lipid containing wastewater treatment". Matsumiya Y. y col (2007) *Journal of Bioscience and Bioengineering* N.º, Vol 4, 325-330.

35 El documento US2006106120 describe una mezcla de microorganismo, biotensioactivo y una enzima degradante de plástico para la biorremediación de materiales fabricados por el hombre. El biotensioactivo puede derivar de bacterias u otras fuentes; la enzima preferida usada en los ejemplos es una cutinasa de origen bacteriano. Puede co-expresarse con amilasa e hidrofobina. Las composiciones no se usan para limpiar.

Los siguientes documentos se refieren a combinaciones de biotensioactivos y enzimas no específicamente producidas a partir de bacterias, para limpiar.

40 El documento US2006080785A (Nero) describe limpieza de alfombras aplicando una composición de limpieza que tiene biotensioactivos y enzimas a la alfombra; y limpiar con una mopa el material. Las enzimas derivan de algas marinas y de esta manera no derivan bacteriamente.

El documento CN101126052 describe un biotensioactivo que contiene la composición de limpieza que también contiene una proteasa. El origen de la proteasa es una planta de piña.

45 El documento US5417879 (Unilever) describe una composición de lavado de ropa tensioactiva dual sinérgica que contiene un biotensioactivo glucolípido esforolípido (de levaduras), lípido de celobiosa (de hongos) o ramnolípido (de bacterias). Los ejemplos que usan estos tensioactivos no comprendían ninguna enzima. En la columna 12 líneas 24 a 25, se menciona como posible combinar los biotensioactivos con na cantidad no desvelada de enzima de origen no desvelado.

50

El documento US2004171512A (Igarashi Keisuke; Hirata Yoshihiko; Furuta Taro) desvela composiciones detergentes de baja formación de espuma que comprenden un biotensioactivo (esforolípido de levaduras) que puede reemplazar a un tensioactivo no iónico de polímero en bloque de baja formación de espuma convencional. De acuerdo con la divulgación general, el biotensioactivo puede usarse con un tipo no desvelado de enzima seleccionado de amilasa, proteasa, celulasa, lipasa, pululanasa, isopululanasa, isoamilasa, catalasa, peroxidasa o similares. La enzima puede añadirse seleccionando apropiadamente a la luz de su especificidad de sustrato. Por ejemplo, la proteasa puede seleccionarse para una mancha de proteínas y una amilasa puede usarse para una mancha de almidón. Los ejemplos usan los esforolípidos para lavar los platos (limpieza de superficie dura) en combinación con Savinasa 6.0T una proteasa de Novo Nordisk y Duramil 60T una enzima lítica de almidón (amilasa) de Novo Nordisk. El Duramil se produce a partir de *Bacillus licheniformis* y la Savinasa se produce a partir de *Bacillus clausii*entus, ambas fuentes bacterianas. No se enseña que estas sean fuentes genéricamente preferidas en este documento.

El documento US2009188055A (Stephan Co) desvela composiciones que comprenden estóolidos sulfonados y otros derivados de ácidos grasos. La Tabla 20 proporciona ejemplos proféticos de estos tensioactivos en combinación con otros tensioactivos, incluyendo ramnolípidos. Las enzimas no se incluyen en estos ejemplos. En otras partes del documento, se dice que el rendimiento de limpieza en suciedades grasas se mejora sinérgicamente con los estóolidos usando lipasas. Las enzimas lipasas adecuadas incluyen aquellas producidas por microorganismos del grupo *Pseudomonas*, tales como *Pseudomonas stutzeri* ATCC 19.154, como se desvela en la Patente británica 1.372.034. Las lipasas adecuadas incluyen aquellas que muestran una reacción cruzada inmunológica positiva con el anticuerpo de la lipasa, producida por el microorganismo *Pseudomonas fluorescens* IAM 1057. Esta lipasa está disponible de Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Nagoya, Japón, bajo el nombre comercial Lipasa P "Amano", en lo sucesivo denominada "Amano-P". Las lipasas adecuadas adicionales son lipasas tales como la M1 Lipasa.RTM y Lipomax.RTM (Gist-Brocades). Las lipasas altamente preferidas son la enzima lipolítica D96L derivada de *Humicola launginosa* (un hongo) como se describe en el documento de EE.UU. n.º 6.017.871 enviado el 25 de enero, 2000 (P&G). Preferentemente, se usa la cepa de *Humicola launginosa* DSM 4106. La enzima se incorpora en la composición de acuerdo con la tecnología presente a un nivel de 50 LU a 8500 LU por litro de solución de lavado. Preferentemente, la variante D96L está presente a un nivel de 100 LU a 7500 LU por litro de solución de lavado. Más preferentemente a un nivel de 150 LU a 5000 LU por litro de solución de lavado.

Un documento sugiere combinaciones de biotensioactivos y enzimas derivadas de bacterias para limpiar.

El documento US2004072713A (Unilever) desvela un artículo para usar en un procedimiento de limpieza enzimática de telas, conteniendo dicho artículo uno o más tipos de microorganismos inoos capaces de excretar enzimas útiles en dicho procedimiento de limpieza de telas. En una realización, el microorganismo puede ser una bacteria, aunque también se ejemplifican microorganismos fúngicos. Todos los ejemplos expresan enzimas blanqueantes. Aunque no se usan en los ejemplos el documento especula que es especialmente útil si, además de enzimas, los microorganismos también son capaces de producir otras entidades químicas que contribuyan al procedimiento de limpieza, por ejemplo, biotensioactivos, por ejemplo lipopolisacáridos. No se desvela realmente ningún licor o concentrado de lavado que comprenda una mezcla de biotensioactivos derivados de bacterias junto con enzimas derivadas de bacterias en este documento. Los presentes inventores confían en que la concentración de biotensioactivo habría sido mucho menos de 0,5 g/l.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición de limpieza que comprende una cantidad eficaz de sistema tensioactivo y un sistema enzimático caracterizada porque el sistema tensioactivo comprende al menos el 1 % en peso (en base a la composición de limpieza) de un biotensioactivo de origen bacteriano y al menos una enzima de origen bacteriano seleccionada del grupo que comprende: celulasas, lipasas, esterases, peroxidases/oxidases, oxidorreductases, pectasas, liasas, mannanasas y mezclas de las mismas caracterizada porque el biotensioactivo es un ramnolípido.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para limpiar un sustrato que comprende las etapas de sumergir el sustrato en agua añadiendo una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente al agua para formar un licor de lavado y lavar el sustrato caracterizado porque el tiempo del ciclo de lavado es menos de 60 minutos, preferentemente menos de 30 minutos y la temperatura del agua es menos de 35 °C todas las veces.

Se han descubierto sorprendentes beneficios sinérgicos al limpiar manchas y suciedad cuando ciertas enzimas derivadas de bacterias se combinan con tensioactivos biológicos derivados de bacterias (biotensioactivos).

La combinación puede usarse en cualquier formulación biológica. Las lipasas son una enzima clave para la inserción en composiciones detergentes, especialmente detergentes de lavado de ropa, pero también composiciones diseñadas para limpiar superficies duras tales como composiciones lavavajillas, que limpian cada día suciedad y manchas eficientemente a niveles reducidos de tensioactivos para permitir la concentración de la formulación.

Los presentes inventores ensayaron tres tipos de biotensioactivo: (fúngico, bacteriano y de levadura) en combinación con dos tipos de enzima lipasa (fúngica y bacteriana). El mejor resultado viene de una combinación de enzima derivada bacteriamente con biotensioactivo derivado bacteriamente (Ramnolípido).

Descripción detallada de la invención

5 Enzimas

Enzimas bacterianas

10 Las enzimas bacterianas para usar en la presente invención son celulasas, lipasas, esterases, peroxidadas/oxidadas, pectasas, liasas y mannanasas o mezclas de las mismas. Los genes bacterianos que codifican tales enzimas pueden transferirse a hospedadores de producción de expresión preferidos, que no se limitan a bacterias e incluyen por ejemplo otros hospedadores microbianos. La frase enzima bacteriana como se usa en el presente documento incluye enzimas originalmente de bacterias, no obstante expresadas.

La composición puede comprender cutinasa como se clasifica en EC 3.1.1.74. Un ejemplo de cutinasa bacteriana es aquella de una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas mendocina*, o *Pseudomonas putida*.

15 La enzima puede ser un fosfolípido clasificado como EC 3.1.1.4 y/o 3.1.1.32. Como se usa en el presente documento, 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 una posición externa (sn-1) y en el medio (sn-2) y se esterifican con ácido fosfórico en la tercera posición; el ácido fosfórico, a su vez, puede esterificarse a un amino-alcohol. Las fosfolipasas son enzimas que participan en la hidrólisis de fosfolípidos. Pueden distinguirse varios tipos de actividad fosfolipasa, incluyendo fosfolipasas A₁ y A₂ que hidrolizan un grupo acilo graso (en la posición sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípido; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que puede hidrolizar el grupo acilo graso que queda en el lisofosfolípido. La fosfolipasa C y la fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacilglicerol o ácido fosfatídico respectivamente.

20 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" usado en el presente documento junto con una enzima de la presente invención se destina a cubrir una enzima con actividad Fosfolipasa A₁ y/o Fosfolipasa A₂. La actividad fosfolipasa puede proporcionarse por enzimas que tienen otras actividades, así como, por ejemplo, una lipasa con actividad fosfolipasa. La actividad fosfolipasa puede, por ejemplo, ser de una lipasa con actividad fosfolipasa secundaria. En otras realizaciones de la presente invención, la actividad de enzima fosfolipasa se proporciona por una enzima que tenga esencialmente sólo actividad fosfolipasa y en la que la actividad de enzima fosfolipasa no sea una actividad secundaria.

25 Preferentemente, la fosfolipasa es de origen bacteriano de *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*.

30 Las celulasas adecuadas son especialmente de origen bacteriano. Se incluyen los mutantes químicamente modificados o con ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Clostridia*.

35 Las peroxidadas / oxidadas adecuadas son especialmente de origen bacteriano. Se incluyen los mutantes químicamente modificados o de ingeniería de proteínas. Un ejemplo de una bacteria oxidativa es, pero no se limita a, *Aeromonas sp.* de las cuales pueden obtenerse oxidadas.

Los ejemplos de pectato liasas incluyen pectato liasas que se han clonado de diferentes géneros de bacterias tales como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Xanthomonas*, así como de *Bacillus subtilis* (Nasser y col. (1993) FEBS Letts. 335:319-326) y *Bacillus sp.* YA-14 (Kim y col. (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58:947-949).

40 Los ejemplos de mannanasas (EC 3.2.1.78) incluyen aquellos aislados de varias bacterias, incluyendo organismos de *Bacillus*. Por ejemplo, Talbot y col., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56, n.º 11, pp. 3505-3510 (1990) describe una beta-mannanasa derivada de *Bacillus stearothermophilus*. Mendoza y col., World J. Microbiol. Biotech., Vol. 10, n.º 5, pp. 551-555 (1994) describe una beta-mannanasa derivada de *Bacillus subtilis*. El documento JP-A-03047076 desvela una beta-mannanasa derivada de *Bacillus sp.* El documento JP-A-63056289 describe la producción de una beta-mannanasa alcalina termoestable. El documento JP-A-63036775 se refiere al microorganismo *Bacillus* FERM P-8856 que produce beta-mannanasa y beta-mannosidasa. El documento JP-A-08051975 desvela beta-mannanasas alcalinas de *Bacillus sp.* AM-001 alcalófilo. Una mannanasa purificada de *Bacillus amyloliquefaciens* se desvela en el documento WO 97/11164. El documento WO 91/18974 describe una hemicelulasa tal como una glucanasa, una xilanasa o una mannanasa activa. Las mannanasas de *Bacillus sp.* se tratan en los Ejemplos del documento WO 99/64619.

La composición puede comprender además otras enzimas de origen bacteriano y/o enzimas que no son de origen bacteriano.

Biotensioactivos

5 Estos derivan de bacterias. Otros tensioactivos fuera del ámbito de la presente invención pueden derivar de bacterias y hongos. En la presente invención el biotensioactivo es un ramnolípido. El término Biotensioactivo en la presente memoria descriptiva de patente no incluye tensioactivos derivados de material vegetal, tales como alquil poliglucósidos (APG).

a) Biotensioactivos derivados bacterialmente

10 Estos son, por ejemplo, los Ramnolípidos típicamente de *Pseudomonas sp.* La información acerca de otros biotensioactivos derivados bacterialmente está disponible a partir de "Mapping of Patents in Bioemulsifiers and biosurfactants - review", publicado en el Journal of Scientific and Industrial Research Vol. 65, 2006, p 91. Dentro de la definición de tensioactivos producidos bacterialmente, los presentes inventores incluyen aquellos donde se clona un gen bacteriano y posteriormente se expresa a partir de otro organismo como una técnica de fabricación. Por ejemplo, los ramnolípidos se han producido en *E. coli* de esta manera.

b) Biotensioactivos de fuentes no bacterianas

15 Los biotensioactivos de fuentes microbianas no bacterianas incluyen aquellas derivadas de hongos y levaduras, por ejemplo, esforolípidos de *Candida sp.* y *Torulopsis sp.*, *Candida apicola*, *Candida bombicola*, *Candida lipolytica*, *Candida bogoriensis*. Véase: Environmental applications for biosurfactants - Environmental Pollution, Volumen 133, 2005, páginas 183-198 Catherine N. Mulligan. Véase también, Towards commercial production of microbial surfactants - Trends in Biotechnology, Volumen 24, 2006, páginas 509-515: Soumen Mukherjee, Palashpriya Das, Ramkrishna Sen.

Los lípidos de mannosileritritol son típicamente de *Pseudozyma* (anteriormente *Candida*) *antarctica*. Los lípidos de celobiosa son típicamente de *Ustilago maydis*. Los lípidos de trehalosa son típicamente de *Rhodococcus sp.*

25 Se da información adicional en Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants Review - Biotechnology - Volumen 7, 2008, página 370: Pattanathu, Rahman y Gakpe.

30 La composición detergente puede comprender otros ingredientes comúnmente encontrados en líquidos de lavado de ropa. Especialmente polímeros, hidrótopos, opacificantes, colorantes, perfumes, otras enzimas, otros tensioactivos, microcápsulas de ingredientes tales como perfume o aditivos de cuidado, suavizantes, polímeros para la anti redeposición de la suciedad, blanqueadores, activadores de blanqueadores y catalizadores de blanqueadores, antioxidantes, agentes de control de pH y tampones, espesantes, estructurantes externos para la modificación de la reología, señales visuales, con o sin ingredientes funcionales embebidos en los mismos y otros ingredientes de liberación de suciedad de sustantivo poliéster conocidos por aquellos expertos en la materia. La composición es preferentemente un líquido y está ventajosamente envasado en una botella multidosis o en una bolsa soluble de dosis unitaria.

35 La presente invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

En este ejemplo, se ensayaron diversas composiciones de Enzima / biotensioactivo para determinar su capacidad para retirar una mancha coloreada de ternera de tejido de algodón.

40 Las soluciones de lavado se prepararon dispersando lipasa a una concentración de 4 mg de proteína por litro junto con tensioactivo detergente a la concentración requerida en solución salina con tampón fosfato (PBS por sus siglas en inglés) ajustada a pH 8 y 12 °FH de dureza. Se mezclaron 10 ml de 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. Se añadieron muestras (de aproximadamente 1 cm²) de tejido de algodón manchado con grasa de ternera coloreada con Rojo Sudán y los
45 viales volvieron al incubador en agitación. Las muestras se retiraron a intervalos de tiempo, se aclararon en agua ría y se secaron a 37 °C. El color residual se monitorizó usando un Macbeth Colour Eye, y se comparó con tejidos manchados sin tratar. Los resultados se muestran en la Tabla 1 durante 30 minutos y la Tabla 2 durante 4 horas.

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

La enzima fúngica es "Lipolasa", derivada de *Humicola languginosa* como se describe en el documento EP 0 258 068 y está disponible de NovoZymes A/S.

Los detalles de los tensioactivos fueron como sigue:

- EL = Esforolípido: un tensioactivo de origen fúngico.
- AC = Accell: un biotensioactivo derivado de una levadura.
- RL = Ramnolípido: un biotensioactivo de origen bacteriano.

5

Tabla 1 - 30 min

Biotensioactivo	Sin enzima	Enzima bacteriana	Enzima fúngica
0,25 g/l de EL	2,83	8,42	4,29
0,25 g/l de AC	0,96	2,39	1,25
0,25 g/l de RL	3,35	5,40	3,29
0,5 g/l de EL	8,98	11,20	8,44
0,5 g/l de AC	1,05	1,95	1,00
0,5 g/l de RL	1,28	10,00	0,82

Tabla 2 - 4 horas

Biotensioactivo	Sin enzima	Enzima bacteriana	Enzima fúngica
0,25 g/l de EL	5,52	12,98	8,61
0,25 g/l de AC	3,67	9,15	3,19
0,25 g/l de RL	3,12	8,01	3,36
0,5 g/l de EL	12,33	13,59	11,29
0,5 g/l de AC	2,22	8,40	3,52
0,5 g/l de RL	1,38	12,01	2,34

10 La enzima bacteriana supera de forma consistente la enzima fúngica para todos los tipos de manchas. Para los Esforolípidos la presencia de la enzima fúngica no proporciona beneficio sobre el tensioactivo usado sin ninguna enzima.

Las enzimas se dosificaron todas al mismo nivel determinando la cantidad de proteína enzimática activa en cada una de las muestras usando un kit de ensayo de proteínas BCA convencional (de Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante.

15 **Ejemplo 2**

En este ejemplo, se examinaron diversas composiciones de enzima/Biotensioactivo para determinar su capacidad para retirar una mancha de ternera coloreada.

20 Se llevó a cabo la misma experimentación que en el Ejemplo 1 excepto que el material de ramnolípido se separó en sus componentes mono-ramnolípido y di-ramnolípido. El di-ramnolípido tiene dos azúcares de ramnosa en su grupo acilo. Los presentes inventores usan la notación R1 para el mono ramnolípido y R2 para el material di-ramnolípido. Los resultados de limpieza para 1 hora y 4 horas se dan en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3 - 1 hora

Biotensioactivo	Sin enzima	Enzima bacteriana	Enzima fúngica
0,5 g/l de EL	6,34	10,28	9,72
0,5 g/l de RL	1,15	8,88	1,04
0,5 g/l de R1	9,85	11,31	12,25
0,5 g/l de R2	0,80	8,87	1,05

Tabla 4 -Á hora•

Biotensioactivo	Sin enzima	Enzima bacteriana	Enzima fúngica
0,5 g/l de EL	10,25	12,54	11,17
0,5 g/l de RL	1,18	10,68	1,89
0,5 g/l de R1	14,52	12,43	14,19
0,5 g/l de R2	1,14	11,42	2,85

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de limpieza que comprende una cantidad eficaz de sistema tensioactivo y un sistema enzimático **caracterizada porque** el sistema tensioactivo comprende al menos un 1 % en peso (en base a la composición de limpieza) de un biotensioactivo de origen bacteriano y al menos una enzima de origen bacteriano seleccionada del grupo que comprende: celulasas, lipasas, esterases, peroxidasas/oxidasas, oxidorreductasas, pectasas, liasas, mannanasas y mezclas de las mismas **caracterizada porque** el biotensioactivo es un ramnolípido.
2. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1 en la que la enzima se selecciona del grupo que consiste en lipasa, celulasa, mannanasa, esterasa, oxidorreductasa y mezclas de los mismos.
- 10 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la enzima comprende lipasa y / o esterasa, preferentemente lipasa.
4. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en la que el ramnolípido comprende dos o más unidades de ramnosa en la cadena acilo, preferentemente es al menos un 60 % de di-ramnolípido.
- 15 5. Un procedimiento de limpieza de un sustrato que comprende las etapas de sumergir el sustrato en agua añadiendo una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior al agua para formar un licor de lavado y lavar el sustrato **caracterizado porque** el tiempo del ciclo de lavado es menos de 60 minutos, preferentemente menos de 30 minutos y la temperatura del agua es menos de 35 °C en todo momento.