

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 588**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2011** **PCT/EP2011/072509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012** **WO12080201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2011** **E 11793816 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017** **EP 2652114**

54 Título: **Detergente o agente de lavado líquidos estables al almacenamiento, que contienen proteasa y celulasa**

30 Prioridad:

17.12.2010 DE 102010063457

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

07.02.2018

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Carl Bosch Strasse 38
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**WIELAND, SUSANNE;
MAURER, KARL-HEINZ;
O'CONNELL, TIMOTHY y
HELLMUTH, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 653 588 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

Detergente o agente de lavado líquidos estables al almacenamiento, que contienen proteasa y celulasa

La invención está en el campo de los detergentes y agentes de lavado. La invención se refiere en particular a detergentes y agentes de lavado líquidos que contienen enzimas, que contienen proteasas definidas en combinación con una celulasa, y propone además procedimientos en los cuales se aplican tales agentes. La invención se refiere además a aplicaciones de proteasas definidas, en detergente o agente de lavado líquidos, que contienen una celulasa.

Para detergentes y agentes de lavado se usan preferiblemente proteasas del equipo de la subtilisina. Las proteasas usadas en los detergente o agente de lavado conocidos del estado de la técnica provienen bien sea originalmente de microorganismos, por ejemplo de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, o *Pseudomonas*, y/o son producidos de acuerdo con procedimientos biotecnológicos conocidos mediante microorganismos adecuados, por ejemplo mediante huéspedes transgénicos de expresión de los géneros *Bacillus* o mediante hongos filamentosos.

En particular en los agentes de lavado modernos están presentes de manera creciente otras enzimas, en lo sucesivo en particular celulasas (endoglucanasas). Una celulasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en celulosa (celobiosa), y/o liquenina y/o β -D-glucanos. Frecuentemente están en capacidad de hidrolizar los enlaces 1,4 también en β -D-glucanos, que exhiben aparte de enlaces 1,4, también enlaces 1,3. Dentro de la clasificación EC de las enzimas, el sistema numérico de clasificación para las enzimas, las celulasas exhiben el número EC (inglés "Enzyme Commission number") 3.2.1.4 y numeran de acuerdo con ello hasta la tercera de las seis clases principales de enzimas, las hidrolasas (E.C.3.-.-), a continuación las glicosilasas (E.C. 3.2.-.-) y nuevamente a continuación las glicosidasas (E.C. 3.2.1.-), es decir enzimas que hidrolizan los enlaces O- y/o S-glicosilo. Las celulasas están en capacidad de degradar la celulosa hasta β -glucosa. Las celulasas actúan en consecuencia en particular contra los residuos en la ropa para lavar que contienen celulosa o derivados de celulosa, y catalizan su hidrólisis.

En el documento WO 95/23221 se divulgan proteasas o variantes de proteasa del tipo de la subtilisina de *Bacillus lentus* DSM 5483, que son adecuadas para el uso en detergente o agente de lavado. Entre estas proteasas esta también una que puede exhibir un intercambio de aminoácidos R99E, A, S o G. Además, se divulga que los agentes de lavado pueden contener otras enzimas, a continuación también una celulasa. Los agentes de lavado pueden ser sólidos o líquidos. Sin embargo, no se desprende de ese escrito de una manera inmediata y clara un agente líquido de lavado que contenga una celulasa en combinación con una proteasa, que en la posición 99 exhiba el aminoácido ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D) o el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q) o el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S). De modo correspondiente esto aplica para el documento EP 1921147.

Una desventaja de los detergentes y agentes de lavado líquidos que contienen proteasa y celulasa del estado de la técnica, es que no son suficientemente estables al almacenamiento, y en consecuencia ya después de corto tiempo pierden de una manera considerable una actividad celulolítica y/o proteolítica, en particular celulolítica. Frecuentemente, la presencia de proteasa conduce a la pérdida de la actividad celulolítica, puesto que la proteasa inactiva la celulasa. El detergente o agente de lavado no muestra ya entonces ningún poder óptimo de limpieza.

La presente invención basa el objetivo en superar las desventajas mencionadas, y preparar detergentes y agentes de lavado líquidos que contienen proteasa y celulasa, que tengan una estabilidad al almacenamiento suficiente o mejorada, en particular respecto a su actividad celulolítica.

Por ello, un objetivo de la invención es un detergente o agente de lavado líquido, que comprende

(a) una proteasa, que es elegida de entre el grupo consistente en

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2;

b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada frente a SEQ ID NO. 2 en por lo menos una posición, en la que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. treonina en la posición 3 (3T),

ii. isoleucina en la posición 4 (4I),

iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),

iv. ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),

v. prolina en la posición 188 (188P),

vi. metionina en la posición 193 (193M),

vii. isoleucina en la posición 199 (199I),

5 viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),

ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

(b) una celulasa.

Además, se divulga un detergente o agente de lavado líquido que comprende

10 (a1) una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 %, a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D), o

(a2) una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q), o (a3) una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S), y

(b) una celulasa.

20 De modo sorprendente, se estableció que un detergente o agente líquido de lavado, que contiene una combinación de una proteasa tal con una celulasa, es estable al almacenamiento de manera ventajosa. En particular exhibe una elevada actividad celolítica después del almacenamiento, en comparación con un detergente o agente de lavado, que se diferencia de un agente de acuerdo con la invención solamente en la proteasa presente en el respectivo agente, en la que en los agentes que van a compararse, la proteasa está presente en la misma concentración al inicio del almacenamiento, referida a la enzima activa. Una proteasa prevista en el marco de la presente invención

25 conduce por ello a una reducción en la inactivación de la celulasa. La reducción en la inactivación de la celulasa por la proteasa prevista en el marco de la presente invención no se basa sin embargo en una insuficiente actividad de proteasa.

Un agente de acuerdo con la invención exhibe respecto a esto y preferiblemente un además buen, en particular ventajoso, poder de limpieza sobre suciedades sensibles a la proteasa. Un poder de limpieza tal respecto a por lo menos una suciedad sensible a proteasa ocurre en particular también a bajas temperaturas, por ejemplo entre 10 °C y 50 °C, preferiblemente entre 10 °C y 40 °C o entre 20 °C y 40 °C. Por ello, un agente así hace posible una eliminación satisfactoria o mejorada de por lo menos una, preferiblemente de varias suciedades sensibles a proteasa sobre textiles y/o superficies duras, por ejemplo vajillas.

30 Respecto al documento WO 95/23221 mencionado en la introducción, la presente invención es con ello una elección ventajosa de modo particular, que conduce a la obtención de un agente líquido de lavado, estable al almacenamiento y eficiente, en particular respecto a la actividad proteolítica y/o celolítica del agente o actividad residual del agente después del almacenamiento.

En el marco de la invención se entiende por poder de limpieza, al poder de blanqueo sobre una o varias suciedades, en particular suciedades de ropa. Son ejemplos de tales suciedades, sangre-leche/tinta china sobre algodón, huevo entero/pigmento sobre algodón, chocolate-leche/tinta china sobre algodón, aceite de maní-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón, pasto sobre algodón o cacao sobre algodón, en particular tales como se indican nuevamente posteriormente. En el marco de la invención, tanto el detergente o el agente de lavado, que comprenden la proteasa y la celulasa como el licor de detergente o limpieza formado por estos agentes, como también la proteasa o la celulasa en sí mismas, exhiben un respectivo poder de limpieza. El poder de limpieza de

40 las enzimas contribuye con ello al poder de limpieza del agente o del licor de detergente o de lavado, formado por el agente. El poder de limpieza es determinado preferiblemente como se indica nuevamente luego.

Se entiende por licor de detergente o de lavado a la solución en uso que contiene el detergente o agente de lavado, que actúa sobre textiles o tejidos (licor de detergente) o superficies duras (licor de lavado) y con ello entra en contacto con las suciedades presentes en textiles o tejidos o superficies duras. Comúnmente, el licor de detergente o limpieza surge cuando comienza el procedimiento de lavado y limpieza y el detergente o agente de lavado es

50

diluido con agua por ejemplo en una lavadora automática o en otro recipiente adecuado.

En el sentido de la invención, está presente una estabilidad al almacenamiento, cuando un detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención, después de un almacenamiento exhibe actividad de celulasa más alta, en comparación con una composición de control, que se diferencia del detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención sólo en la proteasa presente en la composición de control. Por ello, después del almacenamiento, un detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención exhibe una mayor actividad residual de la celulasa en comparación con el control. Por ello, al comienzo del almacenamiento, ambos agentes que se van a comparar exhiben la misma cantidad o concentración de celulasa y/o actividad celulolítica inicial. Además, al comienzo del almacenamiento en ambos agentes la proteasa está presente en la misma concentración, referida a la enzima activa, y ambos agentes son tratados del mismo modo y forma, en particular en lo que se refiere a las condiciones de almacenamiento y la determinación de la actividad enzimática. Con creciente preferencia, el almacenamiento ocurre por al menos 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o 8 semanas. Más preferiblemente, el almacenamiento ocurre a una temperatura de 20 °C, 25 °C o 30 °C, de modo particular preferiblemente a 30 °C.

Al respecto, la actividad enzimática puede ocurrir -ajustada al respectivo tipo de enzima -de modo y forma sencillos. Los procedimientos para la determinación de la actividad son familiares para los expertos en el campo de la tecnología de las enzimas y son aplicados por ellos de manera rutinaria. Por ejemplo, en Tenside, volumen 7 (1970), pp. 125-132 se divulgan procedimientos para la determinación de la actividad de proteasa. La actividad proteolítica puede ser determinada además mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). La proteasa escinde el sustrato y libera pNA. La liberación del pNA da lugar a un aumento en la extinción a 410 nm, cuyo curso a lo largo del tiempo es una medida de la actividad enzimática (véase del Mar et al., 1979). La medición ocurre a una temperatura de 25 °C, a pH 8,6 y una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición es de 5 min para un intervalo de medición de 20s a 60s. La actividad de proteasa es indicada preferiblemente en PE (unidades de proteasa).

La actividad de celulasa es determinada de manera común para los expertos. Preferiblemente la actividad de celulasa es determinada como se indica a continuación. Las celulasas liberan glucosa a partir de CMC (carboximetilcelulosa). Bajo condiciones definidas de reacción (amortiguador de fosfato de sodio 100 mM de pH 7,5, 40 °C, 15 min) se incuban las muestras que están bajo estudio con un sustrato (CMC 1,25 %). Estas reaccionan con hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH) bajo presencia de bismuto, hasta dar un color amarillo, el cual puede ser determinado fotométricamente a 410 nm. Es una condición un valor alcalino de pH durante la reacción de color. La cantidad del azúcar liberado correspondiente al color, es al respecto una medida de la actividad enzimática (véase Lever, Anal. Biochem., 1972, 47 & 1977,81).

En el sentido de la presente invención, de modo particular preferiblemente se determina la presencia de una estabilización de la enzima como se indicó previamente, usando un detergente o agente líquido de lavado que contiene proteasa y celulasa, el cual es almacenado durante por lo menos cuatro y máximo 8 semanas a una temperatura de 30 °C, en el que la actividad proteolítica es determinada mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) desde el sustrato suc-AAPF-pNA, y la actividad celulolítica es determinada como se indicó previamente.

Además, se manifiesta aquí un detergente o agente de lavado que contiene proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que exhibe en la posición 99 en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 el aminoácido ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D) o el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q) o el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S). Con creciente preferencia, la secuencia de aminoácidos es idéntica en por lo menos 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y de modo muy particular preferiblemente hasta 99 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1. SEQ ID NO. 1 es la secuencia de la proteasa alcalina madura (madura) de *Bacillus lentus* DSM 5483, que se divulgan el documento WO 92/21760, y sobre cuya divulgación se hace aquí expresa referencia.

De acuerdo con la invención, se ha probado que mediante la adición de una proteasa tal a un detergente o agente líquido de limpieza, el cual contiene una celulasa, se obtiene un agente líquido de lavado particularmente estable al almacenamiento, en particular respecto a su actividad celulolítica remanente después del almacenamiento, en particular después de una duración de almacenamiento con creciente preferencia de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o 8 semanas.

Una proteasa presente en un detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención exhibe una actividad proteolítica, es decir, es capaz de hidrolizar los enlaces péptido de un polipéptido o proteína. Por ello, es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces péptido, y por ello está en capacidad de escindir péptidos o proteínas. Ella es en particular una subtilasa y de modo particular preferiblemente una subtilisina.

Una celulasa es una enzima como se describió inicialmente. Pueden usarse conceptos sinónimos para celulasas, en particular endoglucanasa, endo-1,4-beta-glucanasa, carboximetilcelulasa, endo-1,4-beta-D-glucanasa, beta-1,4-glucanasa, beta-1,4-endoglucanohidrolasa, celudextrinasa o avicelasa. Para que una enzima sea una celulasa en el sentido de la invención, es decisiva su capacidad de hidrolizar los enlaces 1,4-β-D-glucosídicos en celulosa.

- 5 Las celulasas que pueden confeccionarse de acuerdo con la invención (endoglucanasas, EG) comprenden por ejemplo la preparación de celulasa fúngica, rica en endoglucanasa (EG) o bien sus desarrollos posteriores, que son ofrecidos por la compañía Novozymes bajo el nombre comercial Celluzyme®. Los productos Endolase® y Carezyme® obtenibles así mismo de la compañía Novozymes se basan en la EG de 50 kD, o la EG 43 Kd de *Humicola insolens* DSM 1800. Otros productos comerciales que pueden usarse de esta compañía son Cellusoft®,
- 10 Renozyme® y Celluclean®. Además, pueden usarse por ejemplo celulasas, que son obtenibles de la compañía AB Enzymes, Finlandia, bajo los nombres comerciales Ecostone® y Biotouch®, y que se basan al menos parcialmente en la EG 20 kD de *Melanocarpus*. Otras celulasas de la compañía AB Enzymes son Econase® y Ecopulp®. Otras celulasas adecuadas son obtenibles de *Bacillus* sp. CBS 670.93 y CBS 669.93, en la que la de *Bacillus* sp. CBS 670.93 de la compañía Danisco/Genencor es obtenible bajo el nombre comercial Puradax®. Otros productos
- 15 comerciales que pueden usarse de la compañía Danisco/Genencor son "Genencor detergent cellulase L" e Indi-Age®Neutra. También pueden usarse de acuerdo con la invención variantes de estas enzimas obtenibles mediante mutaciones puntuales. De modo particular las celulasas preferidas son variantes de celulasa de *Thielavia terrestris*, que se divulgan en el documento WO 98/12307, celulasas de *Melanocarpus*, en particular *Melanocarpus albomyces*, que se divulgan el documento WO 97/14804, celulasas del tipo EGIII de *Trichoderma reesei*, que se divulgan el documento EP 1 305 432 o variantes obtenibles de ella, en particular las que se divulgan en los documentos europeos EP 1240525 y EP 1305432, así como celulasas, que se divulgan en los documentos WO 1992006165, WO 96/29397 y WO 02/099091. Por ello, de manera expresa se remite a su respectiva divulgación o su divulgación relacionada es por ello expresamente incorporada en el presente documento.

25 En otra forma de realización de la invención, el detergente o agente de lavado se caracteriza porque la proteasa además en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe por lo menos uno de los siguientes aminoácidos:

- (a) treonina en la posición 3 (3T),
- (b) isoleucina en la posición 4 (4I),
- (c) alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),
- (d) ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
- 30 (e) prolina en la posición 188 (188P),
- (f) metionina en la posición 193 (193M),
- (g) isoleucina en la posición 199 (199I),
- (h) ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
- (i) combinaciones de los aminoácidos (a) a (h).
- 35 Aparte de los aminoácidos mencionados en la posición 99 la proteasa exhibe por ello uno o varios de los aminoácidos mencionados previamente en las respectivas posiciones. Estos aminoácidos pueden causar otras propiedades ventajosas y/o reforzar más las propiedades ya presentes. En particular, los aminoácidos mencionados anteriormente causan un aumento de la actividad proteolítica y/o de la estabilidad de la proteasa en un detergente o agente líquido de lavado o en el licor de lavado formado por este detergente o agente de lavado.
- 40 Mediante el uso de una proteasa así en un detergente o agente líquido de lavado, que contiene una celulasa, se obtiene con ello así mismo un agente de lavado particularmente estable al almacenamiento, en particular respecto a su actividad celulolítica remanente después de almacenamiento, pero preferiblemente también respecto a su actividad proteolítica remanente después del almacenamiento, en particular después de una duración de almacenamiento con creciente preferencia de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3
- 45 semanas, 4 semanas o 8 semanas. Además, tal agente muestra mejorados poderes de limpieza sobre suciedades sensibles a la proteasa y/o celulasa.

Las posiciones de los aminoácidos son definidas para ello mediante una alineación de la secuencia de aminoácidos de la proteasa que va a usarse con la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus*, como se indica en la SEQ ID NO. 1. Puesto que la proteasa de *Bacillus lentus* en el estado de la técnica representa una importante molécula de referencia para la descripción de proteasas y cambios de aminoácidos, es ventajoso

50 en la asignación de las posiciones de aminoácidos hacer referencia a la numeración de la proteasa de *Bacillus lentus* (SEQ ID NO. 1). Además, la numeración se orienta por la proteína madura (madura). Se aplica esta

asignación en particular también cuando la secuencia de aminoácidos de la proteasa que va a ser usada comprende un mayor número de residuos de aminoácido que la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con SEQ ID NO. 1. Partiendo de las posiciones mencionadas en la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus*, las posiciones de aminoácidos en una proteasa que se va a usar de acuerdo con la invención son las que incluso son asignadas a estas posiciones en una alineación.

De acuerdo con ello, aparte de la posición 99, es particularmente ventajoso asignar posiciones a las posiciones 3, 4, 61, 154, 188, 193, 199 y 211, en una alineación con SEQ ID NO. 1 y con ello en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1. En las posiciones mencionadas, en la molécula del tipo silvestre de la proteasa de *Bacillus lentus* están los siguientes residuos de aminoácidos: S3, V4, G61, S154, A188, V193, V199, y L211. De modo particular se prefieren los aminoácidos 3T, 4I, 61A, 154D, 154E, 211D, 211G y 211 E, en tanto las correspondientes posiciones en una proteasa que va a ser usada de acuerdo con la invención, no estén ya ocupadas por uno de estos aminoácidos preferidos. El intercambio de 3T y 4I conduce por ejemplo, mediante un efecto de estabilización de la molécula, a un mejoramiento de la estabilidad al almacenamiento y del poder de limpieza de la proteasa y con ello un mejorado poder de limpieza del detergente o agente líquido de acuerdo con la invención, que contiene la proteasa.

Si uno o varios de los aminoácidos mencionados previamente están materializados en las respectivas posiciones, se tienen como resultado adicionalmente a la posición 99 otras desviaciones de secuencia de SEQ ID NO. 1, puesto que la SEQ ID NO. 1 exhibe otro aminoácido en la respectiva posición. Dependiendo del número de desviaciones que se presentan de SEQ ID NO.1, se tiene como resultado por ello diferentes valores máximos de identidad, que frente a la SEQ ID NO. 1 puede exhibir una proteasa que va a ser usada de acuerdo con la invención, incluso cuando ella debiera coincidir con SEQ ID NO. 1 en todos los otros aminoácidos. Debe considerarse esta circunstancia en el caso individual para todas las posibles combinaciones de los aminoácidos propuestos y depende además de la longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteasa. Por ejemplo la máxima identidad para una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve modificaciones de secuencia es de 99,63 %, 99,26 %, 98,88 %, 98,51 %, 98,14 %, 97,77 %, 97,40 %, 97,03 % o 96,65 % para una secuencia de aminoácidos con una longitud de 269 aminoácidos, o 99,64 %, 99,27 %, 98,91 %, 98,55 %, 98,18 %, 97,82 %, 97,45 %, 97,09 % o 96,73 % para una secuencia de aminoácidos con una longitud de 275 aminoácidos.

La determinación de la identidad de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos ocurre mediante una comparación de secuencias. Tal comparación ocurre mediante la asignación una a otra de secuencias similares en las secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Esta comparación de secuencias ocurre preferiblemente con base en el algoritmo BLAST establecido y comúnmente usado en el estado de la técnica (véase por ejemplo Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410, y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389-3402) y ocurre principalmente mediante la asignación una a otra de secuencias similares de nucleótido o aminoácidos en las secuencias de ácido nucleicos o aminoácidos. Una asignación tabular de las posiciones en cuestión es denominada una alineación. Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el FASTAAlgorithmus. Las comparaciones de secuencia (alineaciones), en particular comparaciones múltiples de secuencia, son producidas comúnmente con programas de computador. Frecuentemente se usan por ejemplo la serie Clustal (véase por ejemplo Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (véase por ejemplo Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas que se basan en estos programas o algoritmos. En el marco de la presente invención, se realizan comparaciones de secuencia y alineaciones preferiblemente con el programa de computador Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EEUU) con los parámetros estándar previamente indicados (por defecto).

Tal comparación permite una declaración sobre la similitud mutua de las secuencias comparadas. Ella es indicada comúnmente en porcentaje de identidad, es decir la fracción de nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos en la misma o en posiciones correspondientes mutuamente a una alineación. El otro concepto concebido de la homología involucra en la consideración para secuencia de aminoácidos, los intercambios conservados de aminoácidos, por consiguiente aminoácidos con propiedades similares, puesto que dentro de la proteína estos ejercen usualmente actividades o funciones similares. Por ello, la similitud de las secuencias comparadas puede ser indicada también como homología porcentual o similitud porcentual. Los datos de identidad y/u homología pueden ser afectados sobre la totalidad del polipéptido o genes o sólo en zonas individuales. Las zonas homólogas o idénticas de diferentes secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos son definidas por ello mediante coincidencias en las secuencias. Frecuentemente exhiben funciones iguales o similares. Pueden ser pequeñas y comprender sólo pocos nucleótidos o aminoácidos. Frecuentemente tales zonas pequeñas ejercen para la actividad total de la proteína, funciones esenciales. Por ello puede ser razonable referirse a coincidencias de

secuencia sólo en zonas individuales, dado el caso pequeñas. En tanto no se indique de otro modo, los datos de identidad u homología en la presente invención se refieren sin embargo a la longitud total de la respectiva secuencia indicada de ácidos nucleicos o aminoácidos. Además, se divulga aquí que la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 como se indicó anteriormente, y que es obtenida o es obtenible a partir de una proteasa de acuerdo con SEQ ID NO. 1 mediante sustituciones simples o múltiples de aminoácidos que conservan, en las que la proteasa en la posición 99 exhibe todavía uno de los aminoácidos previstos para esta posición, como se describió previamente. El concepto "sustitución de aminoácidos que conserva" significa el intercambio (sustitución) de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido en el que este intercambio no conduce a una modificación en la polaridad o carga en la posición del aminoácido intercambiado, por ejemplo el intercambio de un residuo apolar de aminoácido por otro residuo apolar de aminoácido. En el marco de la invención, las sustituciones de aminoácidos que conservan comprenden por ejemplo: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

En otra forma de realización de la invención, un detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención se caracteriza además porque su poder de limpieza corresponde por lo menos al de un detergente o agente de lavado, que contiene una proteasa, la cual comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2. Además, se divulga aquí un detergente o agente de lavado caracterizado porque su poder de limpieza corresponde por lo menos al de un detergente o agente de lavado que contiene una proteasa, la cual comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8, de modo particular preferiblemente la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2. El poder de limpieza es determinado en un sistema de lavado que contiene un detergente que tiene una celulasa en una dosificación entre 2,0 y 9,0 gramos por litro de licor de lavado, así como la proteasa, en el que se usan en la misma concentración (referida a la proteína activa) las proteasas que van a ser comparadas y se determina el poder de limpieza frente a una o varias de las suciedades sangre-leche/tinta china sobre algodón, huevo entero/pigmento (huevo completo /hollín) sobre algodón, aceite de maní-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón y pasto sobre algodón, en particular frente a una o varias de las suciedades - sangre-leche/tinta china sobre algodón: producto Nr. C-05 obtenible de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Holanda

-huevo entero/pigmento (huevo completo/hollín) sobre algodón: producto Nr. 10N obtenible de la compañía wfk Testgewebe GmbH; Brügggen-Bracht, Alemania, o producto C-S-37 obtenible de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Holanda

-aceite de maní-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón: producto Nr. PC-10 obtenible de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Holanda

-grasa sobre algodón: producto Nr. 164 obtenible de la compañía Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, San Gallen, Suiza,

mediante medición del grado de blancura de los textiles lavados, el procedimiento de lavado ocurre por al menos 30 minutos, opcionalmente 60 minutos, a una temperatura de 20 °C y el agua exhibe un grado de dureza entre 15,5 y 16,5° (dureza alemana).

El detergente para el sistema de lavado en un detergente líquido, que se compone como sigue (todos los datos en porcentaje en peso): 0,3-0,5 % de xantano, 0,2-0,4 % de agente antiespumante, 6-7 % de glicerina, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (etersulfato de alcohol graso), 24-28 % de tensioactivo no iónico, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato de sodio (dihidrato), 2-4 % de soda, 14-16 % de ácidos grasos de coco, 0,5 % de HEDP (1-hidroxietano-(ácido 1,1-di-fosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de aclarador óptico, 0-0,001 % de colorante, 0,0002-0,06 % de celulasa (proteína activa), preferiblemente Ecostone N400® (preparación de celulasa de la compañía AB Enzymes), el resto de agua desmineralizada. La proteasa es usada en el detergente en una concentración de 0,001-0,1 %, preferiblemente de 0,01 a 0,06 %, referida a la proteína activa. La dosificación del detergente líquido esta entre 2,0 y 9,0, preferiblemente entre 3,0 y 8,2, entre 4,0 y 7,5 y de modo particular preferiblemente 4,7 gramos por litro de licor de lavado. Se lava en un intervalo de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferiblemente entre pH 8 y pH 9. Ni la actividad de proteasa ni la de celulasa en el licor de lavado son cero al comienzo de lavado.

El grado de blancura, es decir el blanqueo de las suciedades, como medida del poder de limpieza es determinado con procedimientos ópticos de medición, preferiblemente fotométricamente. Un aparato adecuado para ello es por ejemplo el espectrómetro Minolta CM508d. comúnmente los aparatos usados para la medición son calibrados previamente con un estándar de blanco, preferiblemente un estándar de blanco acompañado en la compra.

En otra forma de realización de la invención, el detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención se

caracteriza además porque su estabilidad al almacenamiento corresponde por lo menos a la del detergente o agente de lavado, que contiene una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2. Además, se divulga aquí un detergente o agente de lavado, caracterizado porque su estabilidad al almacenamiento corresponde por lo menos a la del detergente o agente de limpieza, que contiene una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8, de modo particular preferiblemente indicada en SEQ ID NO. 2. Se presenta una estabilidad al almacenamiento tal entonces cuando el detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención, después de un almacenamiento de ocho semanas a 30 °C exhibe una actividad de celulasa igual o mayor a la del detergente o agente de lavado que va a ser usado para comparación, en el que el agente de acuerdo con la invención se diferencia del detergente o agente de lavado que va a ser usado como comparación, sólo por la proteasa presente.

De modo particular preferiblemente el agente que va a ser usado para comparación es un detergente líquido, que se compone como sigue (todos los datos en porcentajes en peso): 0,3-0,5 % de xantano, 0,2-0,4 % de antiespumante, 6-7 % de glicerina, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (etersulfato de alcohol graso), 24-28 % de tensioactivo no iónico, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato de sodio (dihidrato), 2-4 % de soda, 14-16 % de ácidos grasos de coco, 0,5 % de HEDP (1-hidroxietano-(ácido 1,1-di-fosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de aclarador óptico, 0-0,001 % de colorante, 0,0002-0,06 % de celulasa (proteína activa), preferiblemente Ecostone N400® (preparación de celulasa de la compañía AB Enzymes), el resto de agua desmineralizada. La proteasa es usada en el detergente en una concentración de 0,001-0,1 %, preferiblemente de 0,01 a 0,06 %, referida a la proteína activa.

Ambos agentes que van a ser comparados exhiben al inicio del almacenamiento la misma actividad celulolítica inicial, contienen la proteasa en igual concentración referida a la enzima activa, y ambos agentes son tratados del mismo modo y forma. La actividad proteolítica en los agentes es determinada en cada caso mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) del sustrato suc-AAPF-pNA, y su actividad celulolítica es determinada en cada caso como se indicó previamente. Las actividades de partida para la proteasa y la celulasa en los respectivos agentes no son iguales a cero.

Mediante el uso en cada caso de las mismas actividades de las celulasas y el uso de la misma concentración de las proteasas, referidas a la proteína activa, se asegura que también para una eventual brecha mutua de la relación de sustancia activa a proteína total (los valores de la actividad específica), se comparan las propiedades enzimáticas realmente presentes.

En tanto no se indique de otro modo en el marco de la presente invención, se hace referencia en cada caso al peso del detergente líquido, es decir los datos se refieren a su peso.

Numerosas proteasas y en particular subtilisinas se forman como las denominadas preproteínas, por consiguiente junto con un propéptido y un péptido de señal, en el que la función del péptido de señal consiste comúnmente en garantizar la transferencia hacia afuera de la proteasa desde la célula productora en el periplasma o el medio circundante a la célula, y usualmente es necesario el propéptido para el correcto pliegue de la proteasa. Por regla general el péptido de señal y el propéptido están en la parte terminal en N de la preproteína. El péptido de señal es escindido bajo condiciones naturales mediante una peptidasa de señal, de las otras proteasas. A continuación ocurre el pliegue final correcto de la proteasa promovido por el propéptido. La proteasa está entonces en su forma activa y escinde el propéptido en sí mismo. Después de la escisión del propéptido entonces la proteasa madura (madura), en particular subtilisina, ejerce su actividad catalítica sin los aminoácidos terminales en N originalmente presentes. Para aplicaciones técnicas en general y en particular en el marco de la invención, se prefieren las proteasas maduras (maduras), es decir las enzimas procesadas después de su preparación, frente a las preproteínas. Las proteasas pueden ser modificadas lejos de las células que las producen después de la preparación de la cadena de polipéptido, por ejemplo mediante enlace de moléculas de azúcar, formulaciones, introducciones de grupo amino, etc. Tales modificaciones son modificaciones postranslacionales y pueden, sin embargo no tienen que, ejercer una influencia en la función de la proteasa.

Además, la proteasa madura puede también estar acortada en sus extremos terminales en N y/o terminales en C, de modo que en el detergente o agente de lavado divulgado aquí está presente una proteasa acortada frente a SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8, por consiguiente un fragmento. Todos los datos de identidad se refieren en este caso al intervalo, en el cual el respectivo fragmento coincide con una alineación SEQ ID NO. 1. Sin embargo, el respectivo fragmento contiene en cada caso la posición, que coincide con la posición 99 en una alineación con SEQ ID NO. 1, y exhibe en esta posición un aminoácido correspondiente. De modo ventajoso está presente también una o varias de las otras posiciones descritas anteriormente y exhibe allí un aminoácido correspondiente. Además, un fragmento así es proteolíticamente activo. Un fragmento preferido adicionalmente respecto a esto, comprende una

5 secuencia de aminoácidos, que sobre una longitud de por lo menos 50 o por lo menos 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265, 266, 267 o 268 posiciones de aminoácidos coherentes con SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8 coinciden considerando los aminoácidos previamente mencionados para la posición 99 y opcionalmente además para las posiciones 3 y/o 4 y/o 61 y/o 154 y/o 188 y/o 193 y/o 199 y/o 211. De modo particular preferiblemente, el poder de limpieza y/o la estabilidad al almacenamiento de un detergente o agente líquido de lavado con un fragmento así, corresponden por lo menos al de un detergente o agente de lavado, que contiene una proteasa la cual comprende una secuencia de aminoácidos, que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2, determinada en cada caso como se indicó anteriormente. Además, el poder de limpieza y/o estabilidad al almacenamiento de un detergente o agente líquido de lavado divulgado aquí con un fragmento así, corresponde por lo menos al de un detergente o agente de lavado, que contiene una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8, determinada en cada caso como se indicó anteriormente. Otro objetivo de la invención es un detergente o agente de lavado líquido que comprende

(a) una proteasa, que es elegida de entre el grupo consistente en

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2;

20 b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición frente a SEQ ID NO. 2, en la que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. treonina en la posición 3 (3T),

ii. isoleucina en la posición 4 (4I),

iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),

iv. ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),

25 v. prolina en la posición 188 (188P),

vi. metionina en la posición 193 (193M),

vii. isoleucina en la posición 199 (199I),

viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),

ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

30 (b) una celulasa.

Se divulga aquí además un detergente o agente de lavado líquido que comprende

(a) una proteasa, que es elegida de entre el grupo consistente en

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8;

35 b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición frente a SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8, en la que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. treonina en la posición 3 (3T),

ii. isoleucina en la posición 4 (4I),

40 iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),

iv. ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),

v. prolina en la posición 188 (188P),

vi. metionina en la posición 193 (193M),

vii. isoleucina en la posición 199 (199I),

viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),

ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

(b) una celulasa.

- 5 Estas proteasas son usadas de modo muy particular preferiblemente en un detergente o agente de lavado líquido de acuerdo con la invención. Son obtenidas partiendo de SEQ ID NO. 1 mediante la sustitución del aminoácido arginina en la posición 99 por el aminoácido ácido glutámico (E) en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1. Esta secuencia de aminoácidos es indicada en el protocolo de secuencia como SEQ ID NO. 2. Las proteasas divulgadas además aquí son obtenidas partiendo de SEQ ID NO. 1 mediante la sustitución del aminoácido arginina
- 10 en la posición 99 por el aminoácido ácido asparagínico (D) o el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q) o el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S) en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1. Estas secuencias de aminoácidos son indicadas en el protocolo de secuencia como SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y SEQ ID NO. 8. Además, estas proteasas pueden exhibir adicionalmente a los aminoácidos previstos para la posición 99, uno o varios de los aminoácidos aclarados previamente en las
- 15 posiciones 3, 4, 61, 154, 188, 193, 199 y 211, coincidentes en una alineación con SEQ ID NO. 1 y con ello en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1. Los aminoácidos mencionados para estas posiciones provocan también en estas proteasas otras propiedades ventajosas y/o fortalecen propiedades ya presentes. En particular causan una elevación de la actividad proteolítica y/o de la estabilidad de la proteasa en un detergente o agente de lavado líquido o en el licor de lavado formado por este detergente o agente de lavado. Todas las realizaciones
- 20 precedentes - en tanto sean aplicables - son válidas de modo correspondiente para estas proteasas preferidas de modo particular.

- Un agente de acuerdo con la invención contiene la proteasa con creciente preferencia en una cantidad de 1×10^{-8} -5 % en peso, de 0,0001-1 % en peso, de 0,0005-0,5 % en peso, de 0,001 a 0,1 % en peso y de modo particular preferiblemente de 0,001 a 0,06 % en peso, referido a la proteína activa. Un agente de acuerdo con la invención
- 25 contiene la celulasa con creciente preferencia en una cantidad de 1×10^{-8} -5 % en peso, de 0,00001-1 % en peso, de 0,00005-0,5 % en peso, de 0,0001 a 0,1 % en peso y de modo particular preferiblemente de 0,0001 a 0,065 % en peso, referida a la proteína activa. La concentración de proteína puede ser determinada con ayuda de procedimientos conocidos, por ejemplo el procedimiento BCA (ácido bicínico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de Biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), pp. 751-766). La determinación de la concentración de proteína activa ocurrió a este respecto mediante una
- 30 titulación de los centros activos, usando un inhibidor adecuado irreversible (para proteasas por ejemplo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) y determinación de la actividad residual (véase M. Bender et al., J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), pp. 5890-5913).

- La proteasa y/o la celulasa pueden adsorberse además en sustancias de soporte y/o incorporarse en sustancias de
- 35 relleno, para protegerlas contra la inactivación prematura. En el licor de lavado, por consiguiente bajo condiciones de aplicación, se libera entonces las enzimas y pueden desplegar su acción catalítica.

En otra forma de realización de la invención, el detergente o agente de lavado se caracteriza porque además comprende un componente, que es elegido de entre

- i. sustancia aniónica y/o polianiónica, y/o
- 40 ii. sustancia catiónica y/o policatiónica y/o
- iii. sustancia que exhibe grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo.

- Se estableció que la adición de tales sustancias mejora más el poder de limpieza de detergentes y agentes de lavado, en particular de detergentes o agentes de lavado líquidos que contienen proteasas y celulasas, en particular aquellos como los descritos previamente, en particular a temperaturas comparativamente bajas, en
- 45 particular entre 10 °C y 50 °C, entre 10 °C y 40 °C, entre 10 °C y 30 °C y/o entre 20 °C y 40 °C. En particular en combinación con una proteasa que va a ser usada de acuerdo con la invención, ocurre un efecto sinérgico, sobre todo respecto a la eliminación de por lo menos una suciedad sensible a la proteasa, en particular una tal como se describió previamente.

- Las sustancias previamente indicadas bajo i. son sustancias aniónicas o polianiónicas, es decir estas sustancias
- 50 portan por lo menos una y preferiblemente varias cargas negativas. Preferiblemente es un polímero con por lo menos un monómero cargado negativamente, preferiblemente con varios monómeros cargados negativamente. Por ello de acuerdo con la invención, preferiblemente este polímero es un polímero cargado negativamente. Por

ejemplo se prefieren polímeros de ácidos orgánicos o sus sales, en particular poliacrilatos y/o poli-ácidos de azúcares y/o copolímeros de poliacrilato y/o copolímeros de poli-azúcar. Respecto a esto, otros compuestos preferidos son poliacrilsulfonatos o policarboxilatos y sus sales, copolímeros o sales de los copolímeros.

5 Son ejemplos preferidos de modo particular de sustancias que van a ser usadas Acusol 587D (poliacrilsulfonato; compañía Rohm & Haas/Dow Chemical), Acusol 445N (sal de sodio de policarboxilato; compañía Rohm & Haas/Dow Chemical), Acusol 590 (copolímero de poliacrilato; compañía Rohm & Haas/Dow Chemical), Acusol 916 (sal de sodio de poliacrilato; compañía Rohm & Haas/Dow Chemical), Sokalan CP42 (sal de sodio de policarboxilato modificado; compañía BASF), Sokalan PA 30CL (sal de sodio de policarboxilato; compañía BASF), Dequest P 9000 (ácido polimaleico; compañía Thermphos), ácido alginico, ácido poli-2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfónico, sal de sodio de ácido poli-4-estireno sulfónico -co-ácido maleico, sal de sodio de poli-acrilamido-co- ácido acrílico, sal de sodio de ácido poli-metacrílico, poli-metil vinil eter-alt ácido maleico o sales de sodio de ácido polivinilsulfónico.

15 Las sustancias indicadas bajo ii. son sustancias catiónicas o policationicas, es decir estas sustancias portan por lo menos una y preferiblemente varias cargas positivas. Preferiblemente es un polímero con por lo menos un monómero con carga positiva, preferiblemente monómeros con varias cargas positivas. Por ello de acuerdo con la invención, preferiblemente este polímero es un polímero cargado positivamente. Son ejemplos de compuestos preferidos a este respecto las sales de las poliaminas, polietileniminas o sus copolímeros, sales de las polialilaminas, sales de los compuestos de polidialildimetilamonio o poli(acrilamida-co-dialildimetilamonio).

20 Las sustancias indicadas bajo iii. son sustancias que exhiben por lo menos un grupo hidroxilo y/o polihidroxilo y preferiblemente varios grupos hidroxilo y/o polihidroxilo. A este respecto se prefieren por ejemplo polivinilalcoholes, por ejemplo aquellos que están disponibles bajo el nombre comercial Mowiol (compañía Kremer Pigmente GmbH & Co. KG).

25 En este pasaje se hace referencia expresamente a que una sustancia concreta puede pertenecer a uno o varios de los grupos i. a iii. mencionados anteriormente. Por ejemplo puede ser un polímero aniónico, el cual porta uno o varios grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo. Una sustancia así pertenece entonces a los grupos i. y iii. Así mismo, un polímero catiónico, que exhibe uno o varios grupos hidroxilo y/o polihidroxilo, pertenece a los grupos ii. y iii.

30 Así mismo, en el marco de la presente invención pueden usarse derivados de las sustancias previamente mencionadas como pertenecientes a i., ii. o iii.. Se entiende por un derivado en el sentido del presente documento a una sustancia que, partiendo de una de las sustancias previamente mencionadas, es modificada químicamente, por ejemplo mediante la transformación de una cadena lateral o mediante enlace covalente de otro compuesto a la sustancia. Tales compuestos pueden ser por ejemplo compuestos de bajo peso molecular como lípidos o mono-, oligo o polisacáridos o aminas o compuestos de amina. Además, la sustancia puede ser glicosilada, hidrolizada, oxidada, metilada en N, formulada en N, acetilada en N o contener metilo, formilo, etilo, acetilo, t-butilo, anisilo, bencilo, trifluoroacetilo, N-hidroxisuccinimida, t-butiloxicarbonilo, benzoilo, 4-metilbencilo, tioanilo, tiocresilo, benciloximetilo, 4-nitrofenilo, benciloxicarbonilo, 2-nitrobenzoilo, 2-nitrofenilsulfenilo, 4-toluenesulfonilo, pentafluorofenilo, difenilmetilo, 2-clorobenciloxicarbonilo, 2,4,5-triclorofenilo, 2-bromobenciloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, trifenilmetilo, 2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonilo. Así mismo, se entiende por un derivado a la unión covalente o no covalente de la sustancia a un soporte macromolecular, exactamente como también una inclusión no covalente en estructuras macromoleculares de jaula adecuadas. También pueden 40 llevarse a cabo acoplamientos con otros compuestos macromoleculares, como por ejemplo polietilenglicol. Otras modificaciones químicas preferidas son la modificación de uno o más grupos químicos -COOH, -OH, =NH, -NH₂ - SH hasta -COOR, -OR, -NHR, -NR₂, -NHR, -NR, -SR; en los que:

45 R es -CH=CH-R², -C=C-R², -C(R²)=CH₂, -C(R²)=C(R³), -CH=NR², -C(R²)=N-R³, un sistema de anillo de 4-7 de C con o sin sustitución, un heterociclo 4-7 de nitrógeno con o sin sustitución, o una cadena C₂ a C₈ con 1 a 5 enlaces dobles o triples con sustituciones elegidas de entre R¹, R², o R³, en las que

50 -R¹ es H, -R, -NO₂, -CN, sustituyentes halogenuro, -N³, alquilo -C₁₋₈, -(CH₂)_nCO₂R², alquenilo -C₂₋₈ -CO₂R² - O(CH₂)_nCO₂R², -C(O)NR²R³, -P(O)(OR²)₂, tetrazol-5-ilo sustituido con alquilo, arilo -(CH₂)_nO(CH₂)_n, -NR²R³, -(CH₂)_n OR², -(CH₂)_n SR², -N(R²)C(O)R³, -S(O₂)NR²R³, -N(R²)S(O₂)R³, -(CHR¹)_n NR²R³, -C(O)R³, (CH₂)_n N(R³)C(O)R³, -N(R²)CR²R³, cicloalquilo (CH₂)_n sustituido o no sustituido, fenilo o ciclo (CH₂)_n- sustituido o no sustituido; en los que n es un número mayor a 1;

55 -R² es H, sustituyentes halogenuro, alquilo, halogenalquilo, fenilo -(CH₂)_n-, bifenilo -(CH₂)₁₋₃-, -(CH₂)₁₋₄-Ph-N(SO₂-C₁₋₂-alquilo)₂-, -CO(CHR¹)_n-OR¹, heterociclo -(CHR¹)_n-, -(CHR¹)_n-NH-CO-R¹, -(CHR¹)_n-NH-SO₂R¹, -(CHR¹)_n-Ph-N(SO₂-C₁₋₂-alquilo)₂-, -(CHR¹)_n-C(O)(CHR¹)-NHR¹, -(CHR¹)_n-C(S)(CHR¹)-NHR¹, -(CH₂)_nO(CH₂)_nCH₃, -CF₃, acilo -C₂-C₅-, -(CHR¹)_nOH, -(CHR¹)_nCO₂R¹, -(CHR¹)_n-O-alquilo, -(CHR¹)_n-O-(CH₂)_n-O-alquilo, -(CHR¹)_n-S-alquilo, -(CHR¹)_n-S(O)-alquilo, -(CHR¹)_n-S(O₂)-alquilo, -(CHR¹)_n-S(O₂)-NHR³, -(CHR³)_n-N³, -(CHR³)_nNHR⁴, una cadena C₂ a C₈ cadena

alqueno con 1 a 5 enlaces dobles, una cadena C_2 a C_8 cadena alquino con 1 a 5 enlaces triples, heterociclo $-(CHR^3)_n$ sustituido o no sustituido, cicloalquilo $-(CHR^3)_n$ sustituido o no sustituido saturado o no saturado; en los que n es un número mayor a 1 y R^1 y R^3 pueden ser iguales o diferentes;

5 $-R^3$ es H, $-OH$, $-CN$, alquilo sustituido, alqueno C_2 a C_8 , cicloalquilo sustituido o no sustituido, $-N(R^1)R^2$, heterociclo C_5 a C_7 saturado o no saturado o heterobiseclo de 4 a 7 átomos de C,

$-NR^1$, $-NR^2$, $-NR^1R^2$ consistente en un heterociclo saturado o no saturado o un heterobiseclo de 4 a 7 átomos de C;

$-R^4$ es H, $-(CH_2)_nOH$, $-C(O)OR^5$, $-C(O)SR^5$, $-(CH_2)_n C(O)NR^6R^7$, $-O-C(O)-O-R^6$, un aminoácido o un péptido;

en los que n es un número entero entre 0 y 4;

$-R^5$ es H,

10 $-R^6$ es $-C(R^7)-(CH_2)_n-O-C(O)-R^8$, $-(CH_2)_n-C(R^7)-O-C(O)R^8$, $-(CH_2)_n-C(R^7)-O-C(O)-O-R^8$, o $-C(R^7)(CH_2)_n-OC(O)-O-R^8$; en los que n es un número entero entre 0 y 4; y

$-R^7$ y R^8 son en cada caso H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, o alquilo CH_2CO_2 , en los que R^7 y R^8 pueden ser iguales o diferentes.

15 De acuerdo con la invención, es posible además usar todas las combinaciones posibles de las sustancias mencionadas anteriormente como pertenecientes a i., ii. o iii. y/o sus derivados.

Un detergente o agente líquido de lavado de acuerdo con la invención puede ser usado como tal o después de dilución con agua para la limpieza de textiles y/o superficies duras. Una dilución así puede ser preparada diluyendo una cantidad medida del agente en otra cantidad de agua, en determinadas relaciones en peso de agente: agua y
20 opcionalmente sacudiendo esta dilución, para asegurar una distribución uniforme del agente en el agua. Son posibles relaciones en peso o volumen de las diluciones de 1:0 agente: agua a 1:10.000 o 1:20.000 agente: agua, preferiblemente de 1:10 a 1:2.000 agente: agua.

Como detergentes o agentes líquidos de lavado pueden servir aquí todas las formas de presentación líquidas o fluidas. En el sentido del presente documento "fluidos" son al respecto agentes, que pueden ser vertidos y pueden exhibir viscosidades de hasta varios 10.000 mPas. La viscosidad puede ser medida con procedimientos estándar corrientes (por ejemplo viscosímetro Brookfield LVT-II a 20 rpm y 20 °C, aguja 3) y está preferiblemente en el intervalo de 5 a 10.000 mPas. Los agentes preferidos tienen viscosidades de 10 a 8.000 mPas, en los que se prefieren particularmente valores entre 120 a 3.000 mPas. Un detergente o agente líquido de lavado en el marco de la presente invención puede por ello estar también en forma de gel o de pasta, puede estar presente como solución
30 homogénea o suspensión, así como por ejemplo ser atomizable y o estar confeccionado en otras formas comunes de presentación. Entre los detergentes se cuentan todos los tipos imaginables de detergentes, en particular detergentes para textiles, alfombras o fibras naturales. Pueden estar previstos para la aplicación manual y/o también automática. Entre los detergentes se cuentan además agentes auxiliares de lavado, que se dosifican al verdadero detergente en el lavado manual o automático de textiles, para alcanzar otro efecto. Entre los agentes de lavado se cuentan todos los agentes que así mismo existen en todas las formas mencionadas de presentación, para la limpieza y/o desinfección de superficies duras, agentes para el lavado manual y automático de vajillas, limpiadores de alfombras, abrasivos, limpiadores de vidrios, aromatizantes del aire para sanitarios, etc.. Los agentes para tratamiento previo y posterior de textiles son por un lado aquellos agentes, con los cuales se pone en contacto la pieza para lavar antes del verdadero lavado, por ejemplo para solvatar las suciedades persistentes, por
40 el otro lado son aquellos que en una etapa que sigue al verdadero lavado del textil, imparten al objeto que está en lavado otras propiedades deseables, como sensación agradable al tacto, ausencia de arrugas o baja carga estática. Entre los últimos agentes mencionados se cuentan entre otros los suavizantes. Son agentes desinfectantes por ejemplo desinfectantes para manos, desinfectantes para superficies y desinfectantes para instrumentos, que así mismo existen en las mencionadas formas de presentación.

45 En otra forma preferida de realización de la invención, el detergente o agente de lavado se caracteriza porque comprende por lo menos otro ingrediente, en particular uno que es elegido de entre el grupo consistente en fosfonato, tensioactivo, material estructural (relleno), solvente no acuoso, ácido, sal soluble en agua, espesante así como combinaciones de ellos.

Los fosfonatos son sales y compuestos orgánicos, en particular ésteres del ácido fosfónico. Como sales existen fosfonatos primarios ($M'H_2PO_3$ o $HP(O)(OH)(OM')$) y secundarios (M'_2HPO_3 o $HP(O)(OM')_2$), en los que M' representa un metal monovalente. Estos fosfonatos inorgánicos son denominados también como fosfitos primarios o secundarios. Los fosfonatos inorgánicos surgen por ejemplo por reacción de ácido fosfónico $HP(O)(OH)_2$, en

particular la forma de tautómero estable de ácido fosforoso con una base equivalente (primarios) o dos bases equivalentes (secundarios), por ejemplo hidróxido de metal alcalino. En el marco de la presente invención, se prefieren fosfonatos orgánicos sustituidos en P, que exhiben un enlace fósforo-carbono (compuestos orgánicos de fósforo). Su estructura general es $R^1P(O)(OR^2)_2$, con R^1 y/o R^2 = alquilo, arilo o H, en el que los radicales alquilo o arilo exhiben otras sustituciones o pueden portar otros grupos químicos. Los fosfonatos orgánicos sustituidos en P surgen por ejemplo por la reacción de Michaelis-Arbusov. Muchos de esos fosfonatos son solubles en agua. Algunos fosfonatos técnicamente importantes portan además grupo(s) amino en el tipo $NR-(CH_2)_x-PO(OH)_2$ (R = alquilo, arilo o H). Algunos de estos aminofosfonatos tienen similitudes estructurales con formadores de complejos como EDTA, NTA o DTPA y tienen una función similar. En el marco de la presente invención entre los fosfonatos preferidos de modo particular se cuentan en particular organofosfonatos como por ejemplo ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido aminotri(metilenfosfónico) (ATMP, también denominado como ácido aminotris(metilenfosfónico) o ácido nitrolotris(metilenfosfónico) (NTMP)), ácido dietilentriamino-penta(metilenfosfónico) (DTPMP o DETPMP o DTPNT), ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP, también denominado como ácido etilendiamino-tetra(metilenfosfónico) así como ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBS-AM, también denominado como ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico o ácido 3-carboxi-3-fosfonoadípico), que son usados frecuentemente en forma de su sal de amonio o metal alcalino. De modo particular se prefiere la sal de sodio de ácido dietilentriamino-penta(metilenfosfónico). Un fosfonato así es por ejemplo obtenible bajo el nombre comercial Dequest® 2066 (compañía Thermphos).

Preferiblemente el fosfonato está presente en el detergente o agente de lavado en una cantidad de 0,01 a 2,5 % en peso y con creciente preferencia de 0,02 a 2 % en peso, de 0,03 a 1,5 % en peso y en particular de 0,05 a 1 % en peso.

Como tensioactivo(s) puede(n) usarse tensioactivos aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos y/o anfóteros. Desde el punto de vista de las técnicas de aplicación, se prefieren mezclas de tensioactivos aniónicos y/o no iónicos. El contenido total de tensioactivo del detergente o agente líquido de lavado están preferiblemente por debajo de 60 % en peso y de modo particular preferiblemente por debajo de 45 % en peso, referido a la totalidad del detergente o agente líquido de lavado.

Los tensioactivos no iónicos adecuados comprenden alcoholes grasos alcoxilados, alquilésteres de ácidos grasos alcoxilados, amidas grasas, amidas grasas alcoxiladas, amidas de ácidos polihidroxigrasos, alquilfenolpoliglicoléteres, óxidos de amina, alquilpoliglucósidos y mezclas de ellos.

Como tensioactivos no iónicos se usan preferiblemente en particular alcoholes primarios alcoxilados, ventajosamente etoxilados, con preferiblemente 8 a 18 átomos de C y en promedio 1 a 12 mol de óxido de etileno (EO) por mol de alcohol, en los cuales el radical alcohol puede ser lineal o preferiblemente ramificado con metilo en posición 2 o puede contener en mezcla radicales lineales y ramificados con metilo, así como están presentes comúnmente en radicales en oxoalcohol. En particular se prefieren sin embargo alcoholetoxilatos con radicales lineales de alcoholes de origen nativo con 12 a 18 átomos de C, por ejemplo de alcohol de coco, palma, grasa de sebo u oleilo, y en promedio 2 a 8 EO por mol de alcohol. A los alcoholes etoxilados preferidos pertenecen por ejemplo alcoholes C_{12-14} con 3 EO, 4 EO o 7 EO, alcohol C_{9-11} con 7 EO, alcoholes C_{13-15} con 3 EO, 5 EO, 7 EO o 8 EO, alcoholes C_{12-18} con 3 EO, 5 EO o 7 EO y mezclas de estos, como mezclas de alcohol C_{12-14} con 3 EO y alcohol C_{12-18} con 7 EO. Los grados indicados de etoxilación representan valores estadísticos promedio, que para un producto especial pueden ser un número entero o fraccionario. Los etoxilatos de alcohol preferidos exhiben una distribución homóloga concentrada (etoxilatos de intervalo estrecho, NRE). Adicionalmente a estos tensioactivos no iónicos pueden usarse también alcoholes grasos con más de 12 EO. Son ejemplos de ello alcohol de grasa de sebo con 14 EO, 25 EO, 30 EO o 40 EO. También pueden usarse de acuerdo con la invención tensioactivos no iónicos, que contienen grupos EO y PO juntos en la molécula. Además es adecuada también una mezcla de un alcohol graso (más fuerte) etoxilado ramificado y un alcohol graso no ramificado etoxilado, como por ejemplo una mezcla de un alcohol graso C_{16-18} con 7 EO y 2-propilheptanol con 7 EO. En particular preferiblemente el detergente, agente de lavado, agente de tratamiento posterior o agente auxiliar de lavado contiene como tensioactivo no iónico un alcohol graso C_{12-18} con 7 EO o un oxoalcohol C_{13-15} con 7 EO.

El contenido de tensioactivos no iónicos en el detergente o agente de lavado es preferiblemente 3 a 40 % en peso, preferiblemente 5 a 30 % en peso y en particular 7 a 20 % en peso, referido en cada caso a la totalidad de detergente o agente de lavado.

Aparte de los tensioactivos no iónicos, el detergente o agente de lavado puede contener también tensioactivos aniónicos. Como tensioactivos aniónicos se usan preferiblemente sulfonatos, sulfatos, jabones, alquilfosfatos, tensioactivos aniónicos de silicona y mezclas de ellos.

Como tensioactivos del tipo sulfonato entran en consideración al respecto preferiblemente alquilbencenosulfonatos C_{9-13} , olefinsulfonatos, es decir mezclas de alqueno e hidroxialcanosulfonatos así como disulfonatos, como se

obtienen por ejemplo a partir de monoolefinas C_{12-18} con enlace doble terminal o interior mediante sulfonación con trióxido de azufre gaseoso y subsiguiente hidrólisis alcalina o ácida de los productos de sulfonación. Son adecuados también alcanosulfonatos C_{12-18} y los ésteres de ácidos α -sulfograsos (estersulfonatos), por ejemplo los metilésteres α -sulfonados de los ácidos grasos hidrogenados de coco, núcleo de palma o grasa de sebo.

- 5 Como alqu(en)ilsulfatos se prefieren las sales alcalinas y en particular de sodio del semiéster de ácido sulfúrico con alcoholes grasos C_{12-C18} , por ejemplo de alcohol graso de coco, alcohol de grasa de sebo, alcohol laurico, mirístico, cetílico o estearílico o de los oxoalcoholes C_{10-C20} y los semiésteres de alcoholes secundarios de estas longitudes de cadena. A partir de los intereses técnicos de lavado, se prefieren los alquilsulfatos C_{12-C16} y alquilsulfatos C_{12-C15} así como alquilsulfatos C_{14-C15} . También los alquil 2,3-sulfatos son tensioactivos aniónicos preferidos.

También son adecuados los monoésteres de ácido sulfúrico de los alcoholes C_{7-21} de cadena recta o ramificada, etoxilados con 1 a 6 moles de óxido de etileno, como alcoholes C_{9-11} ramificados en posición 2 con metilo, con en promedio 3,5 mol de óxido de etileno (EO) o alcoholes grasos C_{12-18} con 1 a 4 EO.

- 15 También son tensioactivos preferidos los jabones. Son adecuados jabones de ácidos grasos saturados e insaturados, como las sales de ácido laurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido erúrico (hidrogenado) y ácido behénico así como en particular mezclas de jabones derivados de ácidos grasos naturales, por ejemplo ácidos grasos de coco, de núcleo de palma, de oliva o de grasa de sebo.

- 20 Los tensioactivos aniónicos, incluyendo los jabones, pueden estar presentes en forma de sus sales de sodio, potasio o magnesio o amonio. Preferiblemente los tensioactivos aniónicos están presentes en forma de sus sales de sodio. Otros iones contrarios preferidos para los tensioactivos aniónicos son también las formas protonadas de colina, trietilamina o metiletilamina.

El contenido en un detergente o agente de lavado de tensioactivos aniónicos puede ser de 1 a 40 % en peso, preferiblemente 5 a 30 % en peso y de modo muy particular preferiblemente 10 a 25 % en peso, referido en cada caso la totalidad del detergente o agente de lavado.

- 25 Como materiales estructurales (relleno), que pueden estar presentes en el detergente o agente de lavado, se mencionan en particular silicatos, silicatos de aluminio (en particular zeolitas), carbonatos sales de ácidos di- y policarboxílicos orgánicos así como mezclas de estas sustancias.

- 30 Las sustancias orgánicas estructurales que pueden estar presentes en el detergente o agente de lavado, son por ejemplo los ácidos policarboxílicos que pueden usarse en forma de su sal de sodio, en los que se entienden por ácidos policarboxílicos aquellos ácidos carboxílicos que portan más de una función ácido. Por ejemplo estos son ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácidos de azúcar, ácidos aminocarboxílicos, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido metilglicindiacético (MGDA) y sus descendientes así como mezclas de estos. Las sales preferidas son las sales de ácidos policarboxílicos como ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido tartárico, ácidos de azúcar y mezclas de estos.

Como sustancias estructurales son adecuados además policarboxilatos poliméricos. Estos son por ejemplo las sales de metales alcalinos de ácido poliacrílico o ácido polimetacrílico, por ejemplo aquellos con una masa molecular relativa de 600 a 750.000 g / mol.

- 40 Son polímeros adecuados en particular poliacrilatos, que exhiben preferiblemente una masa molecular de 1.000 a 15.000 g / mol. Debido a su solubilidad superior pueden preferirse de este grupo nuevamente los poliacrilatos de cadena corta, que exhiben masas molares de 1.000 a 10.000 g / mol, y de modo particular preferiblemente de 1.000 a 5.000 g / mol.

- 45 Son adecuados además policarboxilatos en forma de copolímeros, en particular aquellos de ácido acrílico con ácido metacrílico y del ácido acrílico o ácido metacrílico con ácido maleico. Para el mejoramiento de la solubilidad en agua, los polímeros pueden contener como monómero también ácidos alilsulfónicos, como ácido aliloxibencenosulfónico y ácido metalilsulfónico.

Preferiblemente, en los detergentes o agentes de lavado líquidos se usan sin embargo sustancias estructurales solubles, como por ejemplo ácido cítrico o polímeros acrílicos con una masa molar de 1.000 a 5.000 g / mol preferiblemente.

- 50 En el sentido de este documento, las masas molares indicadas para policarboxilatos poliméricos son promedios ponderados de masas molares M_w de la respectiva forma ácida, que fueron determinados básicamente mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), en la que se usó un detector UV. Al respecto, la medición ocurrió

contra un estándar externo de ácido poliacrílico el cual, debido a su parentesco estructural con los polímeros investigados entrega valores de peso molar realistas. Estos datos se desvían claramente de los datos de peso molar en los cuales se usa como estándar ácido poliestirenosulfónico. Las masas molares medidas contra ácidos poliestirenosulfónicos son por regla general claramente mayores que las masas molares indicadas en este documento.

Tales sustancias orgánicas de relleno pueden, en caso de desearse, estar presentes en cantidades de hasta 40 % en peso, en particular hasta 25 % en peso y preferiblemente de 1 % en peso a 8 % en peso. Preferiblemente se usan cantidades cercanas a los límites superiores anteriores en agentes en forma de pasta o líquidos, en particular que contienen agua.

Los detergentes o agentes de lavado de acuerdo con la invención son líquidos y contienen preferiblemente agua como solvente principal. Aparte de ello pueden añadirse al detergente o agente de lavado solventes no acuosos. Los solventes no acuosos adecuados comprenden alcoholes mono o polivalentes, alcanolaminas o glicoléteres, en tanto sean miscibles en agua en los intervalos indicados de concentración. Preferiblemente los solventes son elegidos de entre etanol, n-propanol, i-propanol, butanoles, glicol, propanodiol, butanodiol, glicerina, diglicol, propildiglicol, butildiglicol, hexilenglicol, etilenglicolmetiléter, etilenglicoletiléter, etilenglicolpropiléter, etilenglicolmono-n-butiléter, dietilenglicolmetiléter, dietilenglicoletiléter, propilenglicolmetiléter, propilenglicoletiléter, propilenglicolpropiléter, dipropilenglicolmonometiléter, dipropilenglicolmonoetiléter, diisopropilenglicolmonometiléter, diisopropilenglicolmonoetiléter, metoxitriglicol, etoxitriglicol, butoxitriglicol, 1-butoxi-2-propanol, 3-metil-3-metoxibutanol, propilen-glicol-t-butiléter, di-n-octiléter así como mezclas de estos solventes. Sin embargo, se prefiere que el detergente o agente de lavado contenga un poliol como solvente no acuoso. El poliol puede comprender en particular glicerina, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, etilenglicol, dietilenglicol y/o dipropilenglicol. En particular preferiblemente el detergente o agente de lavado contiene una mezcla de un poliol y un alcohol monovalente. Los solventes no acuosos pueden ser usados en el detergente o agente de lavado en cantidades entre 0,5 y 15 % en peso, sin embargo preferiblemente inferiores a 12 % en peso.

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

En el sentido de la invención, un agente puede contener además una o más sales solubles en agua, que sirven por ejemplo para el ajuste de la viscosidad. Al respecto, pueden ser sales orgánicas y/o inorgánicas. Al respecto, las sales inorgánicas que pueden usarse son elegidas preferiblemente de entre el grupo que comprende halogenuros, sulfatos, sulfitos, carbonatos, hidrogenocarbonatos, nitratos, nitritos, fosfatos y/u óxidos incoloros, solubles en agua, de los metales alcalinos, alcalinotérreos, de aluminio y/o de los metales de transición; además pueden usarse sales de amonio. De modo particular al respecto se prefieren halogenuros y sulfatos de metales alcalinos; por ello, preferiblemente la sal inorgánica es elegida de entre el grupo que comprende cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, sulfato de potasio así como mezclas de ellas. Las sales orgánicas que pueden usarse son por ejemplo sales incoloras solubles en agua de metales alcalinos, alcalinotérreos, de amonio, aluminio y/o metales de transición de los ácidos carboxílicos. Preferiblemente las sales son elegidas de entre el grupo que comprende formiato, acetato, propionato, citrato, malato, tartrato, succinato, malonato, oxalato, lactato así como mezclas de ellos.

Para el espesamiento, un agente de acuerdo con la invención puede contener uno o varios agentes espesantes. preferiblemente el agente espesante es elegido de entre el grupo que comprende xantano, guar, carragenina, agar-agar, gelano, pectina, harina de algarroba y mezclas de ellos. Estos compuestos son también agentes espesantes efectivos en presencia de sales inorgánicas. En una forma de realización preferida de modo particular, el detergente o agente de lavado contiene xantano como agente espesante, puesto que el xantano también produce espesamiento de manera efectiva en presencia de elevadas concentraciones de sal e impide una separación macroscópica de la fase continua. Adicionalmente, el agente espesante estabiliza la fase continua pobre en tensioactivo e impide una separación macroscópica de fases.

De modo alternativo o complementario, como agentes espesantes pueden usarse también (co)polímeros de ácido (met)acrílico. Los (co)polímeros adecuados de acrílico y metacrilo comprenden por ejemplo los homopolímeros entrecruzados de alto peso molecular de ácido acrílico con un polialquienilpoliéter, en particular un aliléter de sacarosa, pentaeritritol o propileno (denominación INCI de acuerdo con "International Dictionary of Cosmetic Ingredients" de "The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA)": Carbomer), que también son denominados como polímeros de carboxivinilo. Tales ácidos poliacrílicos son obtenibles entre otros bajo los nombres comerciales Polygel® y Carbopol®. Además, son adecuados por ejemplo los siguientes copolímeros de

ácido acrílico: (i) copolímeros de dos o más monómeros del grupo de ácido acrílico, ácido metacrílico y sus ésteres simples formados preferiblemente con alcoholes C_{1-4} (INCI copolímero de acrilatos), que son obtenibles por ejemplo bajo los nombres comerciales Aculyn®, Acusol® o Tego® Polymer; (ii) copolímeros entrecruzados de alto peso molecular de ácido acrílico, a los cuales pertenecen por ejemplo los copolímeros entrecruzados con un aliléter de sacarosa o de pentaeritritol, de alquilacrilatos C_{10-30} con uno o varios monómeros del grupo del ácido acrílico, ácido metacrílico y sus ésteres simples, formados preferiblemente con alcoholes C_{1-4} (INCI polímero cruzado de acrilatos/alquil acrilato C_{10-30}) y que son obtenibles por ejemplo bajo el nombre comercial Carbopol®. Otros polímeros adecuados son (co)polímeros de ácido (met)acrílico del tipo Sokalan®.

Puede preferirse que el detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención contenga un (co)polímero de ácido (met)acrílico en combinación con otro agente espesante, preferiblemente xantano. El detergente o agente de lavado puede contener 0,05 a 1,5 % en peso y preferiblemente 0,1 a 1 % en peso de agente espesante, referido en cada caso a la totalidad del detergente o agente de lavado. La cantidad de agente espesante usado depende al respecto del tipo de agente espesante y el grado deseado de espesamiento.

Los agentes líquidos o pastosos de acuerdo con la invención en forma de soluciones que contienen solventes corrientes son por regla general fabricados mediante mezcla simple de los ingredientes, que pueden ser añadidos en ausencia de solvente o como solución, a un mezclador automático.

Los detergentes o agentes de lavado de acuerdo con la invención pueden contener exclusivamente una proteasa y una celulasa, como se describió. De modo alternativo, puede contener también otras enzimas hidrolíticas u otras enzimas en una concentración conveniente para la eficacia del agente. Con ello, otro objetivo de la invención es representado por los agentes que además comprenden una o varias otras enzimas, en las que en principio pueden usarse todas las enzimas establecidas en el estado de la técnica para este propósito. Como otras enzimas que pueden usarse preferiblemente están todas las enzimas, que pueden desarrollar una actividad catalítica en el agente de acuerdo con la invención, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, β -glucosidasa, pectinasa, carraginasas, perhidrolasa, oxidasa, oxidoreductasa o una lipasa, así como sus mezclas. Otras enzimas están presentes en el agente de manera ventajosa en cada caso en una cantidad total de 1×10^{-8} a 5 en peso, referido a la proteína activa. Con creciente preferencia, cada otra enzima está presente en el agente de acuerdo con la invención en una cantidad de 1×10^{-7} -3 % en peso, de 0,00001-1 % en peso, de 0,00005-0,5 % en peso, de 0,0001 a 0,1 % en peso y de modo particular preferiblemente de 0,0001 a 0,05 % en peso, referida a la proteína activa. De modo particular preferiblemente las enzimas muestran poderes sinérgicos de limpieza frente a determinadas suciedades o manchas, es decir las enzimas presentes en la composición de agente se promueven mutuamente en su poder de limpieza. De modo muy particular preferiblemente se presenta un sinergismo así entre la proteasa contenida de acuerdo con la invención y otra enzima de un agente de acuerdo con la invención, entre ellas en particular entre la proteasa y la celulasa mencionadas y/o una lipasa y/o una mananasa y/o una amilasa y/o una pectinasa. Los efectos sinérgicos pueden ocurrir no sólo entre diferentes enzimas, sino también entre una o varias enzimas y otros ingredientes del agente de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la invención representa el uso de un detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención, para la eliminación de suciedades, en particular de suciedades sensibles a la proteasa y/o celulasa, sobre textiles o superficies duras, es decir para la limpieza de textiles o de superficies duras. Entonces, los agentes de acuerdo con la invención pueden, en particular sobre la base de la combinación presente de proteasa y celulasa, ser usados de manera ventajosa para retirar las correspondientes impurezas de textiles o de superficies duras. Formas de realización de este objetivo de la invención son representadas por ejemplo por el lavado manual, la eliminación manual de manchas de textiles o de superficies duras o el uso en combinación con un procedimiento automático. Todas las circunstancias, objetivos y formas de realización que se describen para los detergentes o agentes de lavado de acuerdo con la invención, son aplicables también para este objetivo de la invención. Por ello, en este pasaje se remite expresamente a la divulgación en los correspondientes pasajes, advirtiendo que esta divulgación también es válida para el uso precedente de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la invención representa un procedimiento para la limpieza de textiles o de superficies duras, en el que en por lo menos una etapa del procedimiento se aplica un detergente o agente de lavado de acuerdo con la invención.

Allí caen tanto los procedimientos manuales como también los mecánicos, en los que se prefieren los procedimientos mecánicos, debido a la posibilidad de controlarlos con mayor precisión, lo cual afecta por ejemplo las cantidades usadas y los tiempos de acción. Los procedimientos para la limpieza de textiles se distinguen en general porque en varias etapas del procedimiento se aplican sobre el objeto de lavado diferentes sustancias con actividad limpiadora y son lavadas después del tiempo de acción, o porque el objeto de lavado es tratado de otra forma con un detergente o una solución o dilución de este agente. De modo correspondiente, es válido para los procedimientos para la limpieza de todos los otros materiales diferentes a textiles, en particular de superficies

duras. Todos los procedimientos imaginables de lavado o limpieza pueden ser mejorados en al menos una de las etapas del procedimiento para la aplicación de un detergente o agente de lavados de acuerdo con la invención y representan entonces formas de realización de la presente invención. Todas las circunstancias, objetivos y formas de realización que se describen para los detergentes o agentes de lavado de acuerdo con la invención, son aplicables también para este objetivo de esta invención. Por ello, en este pasaje se remite expresamente a la divulgación en los correspondientes pasajes, advirtiendo que esta divulgación también es válida para el uso precedente de acuerdo con la invención.

En una forma de realización preferida, el procedimiento se caracteriza porque la celulasa está presente en el licor de lavado en una concentración de 0,0000004 a 0,0006 % en peso, preferiblemente de 0,0000008 a 0,00048 % en peso, y/o porque la proteasa está presente en el licor de lavado en una concentración de 0,00009 a 0,0005 % en peso, preferiblemente de 0,00015 a 0,00035 % en peso, en la que los datos están referidos a la proteína activa en el licor de lavado. En otra forma de realización preferida el procedimiento se caracteriza porque es ejecutado a una temperatura entre 10 °C y 50 °C, preferiblemente entre 10 °C y 40 °C y de modo particular preferiblemente entre 20 °C y 40 °C.

Las proteasas usadas en los agentes de acuerdo con la invención son, de modo correspondiente con las formas de realización precedentes, que pueden usarse de manera ventajosa en detergentes y agentes de lavado de acuerdo con la invención así como en procedimientos, en particular procedimientos de lavado y limpieza. Pueden ser usadas también de manera ventajosa, para suministrar en los agentes correspondientes una actividad proteolítica.

Además, se manifiesta aquí el uso de una proteasa,

(a1) que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D), o

(a2) que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q) o

(a3) que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S),

para el suministro de una actividad proteolítica en un detergente o agente de lavado líquido, el cual comprende además una celulasa.

En otra forma de realización, este uso se caracteriza porque la proteasa además en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe por lo menos uno de los siguientes aminoácidos:

(a) treonina en la posición 3 (3T),

(b) isoleucina en la posición 4 (4I),

(c) alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),

(d) ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),

(e) prolina en la posición 188 (188P),

(f) metionina en la posición 193 (193M),

(g) isoleucina en la posición 199 (199I),

(h) ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),

(i) combinaciones de los aminoácidos (a) a (h).

Otro objetivo de la invención es formado por el uso de una proteasa, que es elegida de entre el grupo consistente en

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2;

b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada frente a SEQ ID NO. 2 en por lo menos una posición, en la que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el

grupo consistente en:

- i. treonina en la posición 3 (3T),
- ii. isoleucina en la posición 4 (41),
- iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),
- 5 iv. ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
- v. prolina en la posición 188 (188P),
- vi. metionina en la posición 193 (193M),
- vii. isoleucina en la posición 199 (199I),
- viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),

10 ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

para el suministro de una actividad proteolítica en un detergente o agente de lavado líquido, el cual además comprende una celulasa.

Además, se divulga aquí el uso de una proteasa, que es elegida de entre el grupo consistente en

15 a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8;

b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada frente a SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8 en por lo menos una posición, en la que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

x. treonina en la posición 3 (3T),

20 xi. isoleucina en la posición 4 (41),

xii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61R),

xiii. ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),

xiv. prolina en la posición 188 (188P),

xv. metionina en la posición 193 (193M),

25 xvi. isoleucina en la posición 199 (199I),

xvii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211G),

xviii. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

para el suministro de una actividad proteolítica en un detergente o agente de lavado líquido, el cual comprende además una celulasa.

30 Todas las circunstancias, objetivos y formas de realización que se describen para los detergentes o agentes de lavado de acuerdo con la invención, son aplicables también en los usos mencionados. Por ello, en este pasaje se remite expresamente a la divulgación en los correspondientes pasajes, advirtiendo que esta divulgación también es válida para los usos precedentes de acuerdo con la invención.

35 **Ejemplo: determinación de la estabilidad al almacenamiento del detergente líquido de acuerdo con la invención**

Como recetas base del detergente sirvieron

40 a) un primer detergente líquido con la siguiente composición (todos los datos en porcentajes en peso): 0,3-0,5 % de xantano, 0,2-0,4 % de agente antiespumante, 6-7 % de glicerina, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (etersulfato de alcohol graso), 24-28 % de tensioactivo no iónico, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato de sodio (dihidrato), 2-4 % de soda, 14-16 % de ácidos grasos de coco, 0,5 % de HEDP (1-hidroxietano-(ácido 1,1-di-fosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de aclarador óptico, 0-0,001 % de colorante, el resto de

agua desmineralizada. Como celulasa activa estaba presente 0,15 % en peso de Ecostone N400® (preparación de celulasa de la compañía AB Enzymes).

b) Un segundo detergente líquido con la siguiente composición:

Ingrediente	% en peso
Alcohol graso C12-18 con 7 EO	7,5
Alquilbencenosulfonato C10-C13 lin. (sal de Na)	8,5
Acido graso de coco (sal de Na)	14,6
Lauriletersulfato con 2 EO (sal de Na)	13,0
Ingrediente	% en peso
Acido cítrico (sal de Na)	3,1
Acido bórico (sal de Na)	1,0
Espesante de poliacrilato	0,4
Propilenglicol	2,1
Antiespumante de silicona	0,2
Preparación de celulosa Ecostone N400® (compañía AB Enzymes)	0,1
Agua	Hasta 100

- 5 Para las diferentes cargas en ensayo, a las recetas base de detergente se añadieron las siguientes proteasas, en las que los datos están referidos a la proteína activa:

Carga 1: Variante F49 de poder mejorado, de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con WO 95/23221 (Arg en la posición 99 (99R)): 0,4 mg/ml (0,04 % en peso) en los detergentes líquidos según a) y b).

- 10 Carga 2: proteasa, que se divulga en la figura 2 o SEQ ID NO. 3 del documento WO 03/057713 (Ser en la posición 99 (99S; identidad con SEQ ID NO. 1 < 80 %): 0,4 mg/ml (0,04 % en peso) en el detergente líquido de acuerdo con a), 0,3 mg/ml (0,03 % en peso) en el detergente líquido de acuerdo con b).

Carga 3: proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2 (Glu en la posición 99 (99E)): 0,4 mg/ml (0,04 % en peso) en el detergente líquido de acuerdo con a), 0,3 mg/ml (0,03 % en peso) en el detergente líquido de acuerdo con b).

- 15 Se verificó el detergente según las respectivas cargas 1, 2 y 3 respecto a su estabilidad al almacenamiento. Para ello se almacenaron los detergentes a una temperatura de 30 °C por los respectivos intervalos de tiempo indicados y se determinó la respectiva actividad celolítica residual. Bajo condiciones definidas de reacción (amortiguador de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.5, 40 °C, 15 min) se incubaron con un sustrato (carboximetilcelulosa 1,25 %) las muestras que iban a ser investigadas. Estas reaccionaron bajo condiciones alcalinas con hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH) en presencia de bismuto hasta dar un color amarillo, el cual fue determinado fotométricamente a una longitud de onda de 410 nm. La cantidad de azúcar liberado correspondiente al color es al respecto una medida de la actividad enzimática (véase Lever, Anal. Biochem., 1972, 47 & 1977, 81). Las restantes actividades celolíticas obtenidas se indican en la siguiente tabla 1.

Tabla1:

Detergente de acuerdo con	a)			b)		
	Inicio	4 semanas	8 semanas	Inicio	4 semanas	8 semanas
Carga 1	100 %	42 %	27 %	100 %	33 %	21 %
Carga 2	100 %	36 %	24 %	100 %	42 %	24 %

Carga 3	100 %	46 %	32 %	100 %	49 %	26 %
---------	-------	------	------	-------	------	------

Es claro que el detergente de acuerdo con la invención exhibe una actividad residual celulolítica claramente mejorada y con ello estabilidad al almacenamiento, en comparación con los detergentes de las cargas 1 y 2.

Listado de secuencias

<110> Henkel AG & Co. KGaA

5 <120> Detergente o agente de lavado líquido estable al almacenamiento que contiene proteasa y celulasa

<130> H 09326 (PT018971)

<150> DE 102010063457.3

<151> 2010-12-17

<160> 8

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

15 <400> 1

```

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

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

Asp Gly Arg Gly Ala Ile 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

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

```

ES 2 653 588 T3

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175
 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
 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
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 2

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Bacillus lentus

<400> 2

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 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
 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
 Asp Gly Glu Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110

ES 2 653 588 T3

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

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser 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

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

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

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 3

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Bacillus lentus

<400> 3

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

ES 2 653 588 T3

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

Asp Gly Asp Gly Ala Ile 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

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser 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

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

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

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 4

5 <211> 269

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

<400> 4

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

ES 2 653 588 T3

```

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

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

Asp Gly Asn Gly Ala Ile 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

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser 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

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

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

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
      260                      265

```

<210> 5

5 <211> 269

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

ES 2 653 588 T3

<400> 5

Ala	Gln	Ser	Val	Pro	Trp	Gly	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Pro	Ala	Ala	1	5	10	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	
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	
Asp	Gly	Gln	Gly	Ala	Ile	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	
Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Ser	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	
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	
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	
Tyr	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg	260	265					

5

<210> 6

<211> 269

ES 2 653 588 T3

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

<400> 6

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

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

Asp Gly Ala Gly Ala Ile 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

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser 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

ES 2 653 588 T3

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

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

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 7

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Bacillus lentus

<400> 7

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

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

Asp Gly Gly Gly Ala Ile 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

ES 2 653 588 T3

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

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser 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

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

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

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 8

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Bacillus lentus

<400> 8

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

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

ES 2 653 588 T3

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

Asp Gly Ser Gly Ala Ile 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

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser 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

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

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

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

REIVINDICACIONES

1. Detergente o agente de lavado líquidos que comprenden
 - (a) una proteasa, que es elegida de entre el grupo consistente en
 - a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2;
 - 5 b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada frente a SEQ ID NO. 2 en por lo menos una posición, en donde la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:
 - i. treonina en la posición 3 (3T),
 - ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
 - 10 iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),
 - iv. ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
 - v. prolina en la posición 188 (188P),
 - vi. metionina en la posición 193 (193M),
 - vii. isoleucina en la posición 199 (199I),
 - 15 viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
 - ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);
 - (b) una celulasa.
 2. Detergente o agente de lavado de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados porque** la celulasa está presente en una cantidad del 1×10^{-8} al 5 por ciento en peso, referida a la proteína activa, y/o porque la proteasa está presente en una cantidad del 1×10^{-8} al 5 por ciento en peso, referida a la proteína activa.
 - 20 3. Detergente o agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizados porque** comprenden además un componente, que es elegido de entre
 - i. sustancia aniónica y/o polianiónica, y/o
 - ii. sustancia catiónica y/o policatiónica, y/o
 - 25 iii. sustancia que exhibe grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo.
 4. Detergente o agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizados porque** comprenden por lo menos otro ingrediente, en particular uno que es elegido de entre el grupo consistente en fosfonato, tensioactivo, sustancia estructural (relleno), disolvente no acuoso, ácido, sal soluble en agua, agente espesante así como sus combinaciones.
 - 30 5. Detergente o agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizados porque** comprenden por lo menos otra enzima, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, β -glucosidasa, pectinasa, carraginasas, perhidrolasa, oxidasa, oxidoreductasa o una lipasa, así como sus mezclas.
 6. Uso de un detergente o un agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 para la eliminación de suciedades sensibles a proteasa, en textiles o en superficies duras.
 - 35 7. Procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras, **caracterizado porque** en por lo menos una etapa del procedimiento se aplica un detergente o un agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5.
 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** la celulasa está presente en el licor de lavado en una concentración del 0,0000004 al 0,0006 % en peso, y/o **porque** la proteasa está presente en el licor de lavado en una concentración del 0,00009 al 0,0005 % en peso.
 - 40 9. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado porque** es realizado a una temperatura de entre 10 °C y 50 °C, preferiblemente de entre 10 °C y 40 °C y de modo particular preferiblemente de entre 20 °C

y 40 °C.

10. Uso de una proteasa, que es elegida de entre el grupo consistente en

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2;

5 b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición frente a SEQ ID NO. 2, en la que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. treonina en la posición 3 (3T),

ii. isoleucina en la posición 4 (4I),

iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),

10 iv. ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),

v. prolina en la posición 188 (188P),

vi. metionina en la posición 193 (193M),

vii. isoleucina en la posición 199 (199I),

viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),

15 ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

para el suministro de una actividad proteolítica en un detergente o un agente de lavado líquidos, el cual comprende una celulasa.