

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 317**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/36 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2010 PCT/EP2010/063556**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011 WO11032988**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010 E 10760643 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2478097**

54 Título: **Detergente o agente de limpieza líquidos con proteasas estables al almacenamiento**

30 Prioridad:

16.09.2009 DE 102009029513

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

28.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WIELAND, SUSANNE;
SIEGERT, PETRA;
SPITZ, ASTRID;
MAURER, KARL-HEINZ;
O'CONNELL, TIMOTHY;
PRÜSER, INKEN;
SCHIEDEL, MARC-STEFFEN;
EITING, THOMAS;
SENDOR-MÜLLER, DOROTA;
BASTIGKEIT, THORSTEN;
BENDA, KONSTANTIN y
MÜLLER, SVEN**

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 2 661 317 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 limpieza líquidos con proteasas estables al almacenamiento

5 La invención está en el campo de los detergentes y agentes de limpieza líquidos. La invención se refiere en particular al uso de proteasas definidas para el suministro de una actividad proteolítica en un detergente o agente de limpieza líquido, en combinación con un fosfonato, y propone además procedimientos en los cuales se aplican tales agentes.

10 Para detergentes y agentes de limpieza se usan hasta ahora preferiblemente proteasas del tipo subtilisina. Las proteasas usadas en los detergentes o agentes de limpieza conocidos a partir del estado la técnica provienen originalmente de microorganismos, por ejemplo de los géneros Bacillus, Streptomyces, Humicola, o Pseudomonas, y/o son producidos por microorganismos adecuados de acuerdo con procedimientos biotecnológicos de por sí conocidos, por ejemplo mediante huéspedes transgénicos de expresión de los géneros Bacillus o por hongos filamentosos.

15 En particular en detergentes líquidos modernos, pero también en agentes de limpieza, están presentes fosfonatos. Son usados por ejemplo como formadores de complejo, para impedir la precipitación, o como estabilizantes de blanqueo. Como formadores de complejo sirven por ejemplo para eliminar la dureza del agua. Pueden cubrir cationes como Ca^{2+} en la solución y con ello modificar el comportamiento químico el catión. En el caso del calcio, desaparece la propiedad de formar dureza en el agua. También pueden formarse complejos con otros cationes y con ello ser protegidos ante reacciones químicas. Pueden actuar además como inhibidores de corrosión o sirven como estabilizante para peróxidos, en particular en blanqueadores.

20 En el documento internacional WO 95/23221 se divulgan proteasas o variantes de proteasa del tipo subtilisina de Bacillus lentus DSM 5483, que son adecuadas para el uso en detergentes o agentes de limpieza. Entre estas proteasas está también una que puede exhibir un intercambio de aminoácidos R99E, A, S o G. Además, se divulga que el detergente puede contener un fosfonato, en particular un polifosfonato. Los detergentes pueden ser sólidos o líquidos. Sin embargo, de este documento no se desprende ningún detergente o agente de limpieza líquido concreto, que contenga obligatoriamente un fosfonato en combinación con una proteasa tal.

30 Una desventaja de detergentes y agentes de limpieza líquidos que contienen proteasa del estado de la técnica, es que frecuentemente no exhiben una actividad proteolítica satisfactoria, en particular a bajas temperaturas, por ejemplo entre 10 °C y 50 °C, en particular entre 10 °C y 40 °C o entre 20 °C y 40 °C, y por ello el detergente o agente de limpieza no muestra un desempeño óptimo de limpieza. Otra desventaja de detergentes y agentes de limpieza líquidos que contienen proteasa del estado de la técnica, es que no son suficientemente estables al almacenamiento y en consecuencia ya después de un corto tiempo pierden una considerable medida de actividad proteolítica.

35 La presente invención basa el objetivo en superar las desventajas mencionadas y suministrar detergentes o agentes de limpieza, que exhiban una ventajosa actividad proteolítica, en particular a temperaturas como las mencionadas previamente, y además tengan estabilidad mejorada al almacenamiento.

Por ello, un objetivo de la invención es el uso de una proteasa,

40 (a1) que comprenda 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 los aminoácidos ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D), para el suministro de una actividad proteolítica en un detergente o agente de limpieza líquido, el cual comprende un fosfonato en una cantidad de 0,01 a 4 % en peso.

45 De modo sorprendente se estableció que un detergente o agente de limpieza líquido, que contiene la combinación de una proteasa tal con un fosfonato, exhibe desempeño ventajoso de limpieza sobre suciedades sensibles a proteasa y además es ventajosamente estable al almacenamiento. En una forma preferida de realización de la invención, los agentes se caracterizan porque muestran un desempeño de limpieza ventajoso respecto a por lo menos una suciedad sensible a la proteasa a temperaturas entre 10 °C y 60 °C, preferiblemente también a bajas temperaturas, por ejemplo entre 10 °C y 50 °C, entre 10 °C y 40 °C o entre 20 °C y 40 °C. Por ello en una forma de realización, el agente hace posible una eliminación mejorada de por lo menos una, preferiblemente de varias suciedades sensibles a la proteasa en textiles y/o superficies duras, por ejemplo vajillas. Por ello, respecto al documento internacional WO 95/23221 mencionado inicialmente, la presente invención es una elección particularmente ventajosa, que conduce a la obtención de detergente o agente de limpieza líquidos eficientes y estables al almacenamiento.

En el marco de la invención, se entiende por desempeño de limpieza el rendimiento de blanqueo sobre una o

varias suciedades, en particular suciedades de ropa o suciedades de vajilla, que son sensibles a la degradación por las proteasas. Son ejemplos de tales suciedades sangre-leche/tinta china sobre algodón, huevo completo/pigmentos sobre algodón, chocolate-leche/tinta china sobre algodón, aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón, pasto sobre algodón o cacao sobre algodón, en particular aquellos que se indican posteriormente. Son ejemplos de tales suciedades sobre vajillas la leche, carne desmenuzada o yema de huevo. En el marco de la invención, tanto el detergente como agente de limpieza, que comprende la proteasa o el licor de lavado formado por este agente, como también la proteasa en sí misma, exhiben un respectivo poder de limpieza. El poder de limpieza de la enzima hidrolítica contribuye con ello al poder de limpieza del agente o del licor de lavado o limpieza formado por el agente. El poder de limpieza es determinado preferiblemente como se indica posteriormente.

Se entiende por licor de lavado o de limpieza a la solución de uso que contiene el detergente o agente de limpieza, que actúa sobre textiles o tejidos (licor de lavado) o superficies duras (licor de limpieza) y con ello entra en contacto con las suciedades presentes en textiles o tejidos o superficies duras. Comúnmente, el licor de lavado o de limpieza surge cuando comienza el procedimiento de lavado de limpieza y se diluye con agua el detergente o agente de limpieza por ejemplo en una lavadora de ropa, lavadora de losa o en otro recipiente adecuado.

En una forma de realización de la invención, el detergente o agente de limpieza 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, los aminoácidos ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D). 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 particularmente preferido en 99 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1. SEQ ID NO. 1 es la secuencia de la proteasa alcalina madura (*mature*) de *Bacillus lentus* DSM 5483, que se divulga en el documento internacional WO 92/21760, y sobre cuya divulgación se hace aquí expresa referencia.

La proteasa presente en un detergente o agente de limpieza de acuerdo con la divulgación comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1, en por lo menos 80 % y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe los aminoácidos asparagina (N) o glutamina (Q) o los aminoácidos 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 particularmente preferido en 99 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1. SEQ ID NO. 1 es la secuencia de la proteasa alcalina madura (*mature*) de *Bacillus lentus* DSM 5483, que se divulga en el documento internacional WO 92/21760, y sobre cuya divulgación se hace aquí expresa referencia.

De acuerdo con la invención se ha mostrado que mediante la adición de una proteasa así a un detergente o agente de limpieza líquido, que contiene un fosfonato, se obtiene un detergente líquido particularmente estable al almacenamiento, en particular respecto a su actividad proteolítica remanente después del almacenamiento, en particular después de un período de almacenamiento de 1 a 5 semanas, 1 a 4 semanas, 1,5 a 3 semanas y de modo particularmente preferido después de 2 semanas.

Una proteasa presente en un detergente o agente de limpieza 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, en particular una subtilisina.

En otra forma de realización de la invención, el detergente o agente de limpieza se caracteriza porque la proteasa exhibe en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 además 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 61R),

(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 (211D, 211E o 211G),

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

Por ello, aparte de uno de los aminoácidos mencionados en la posición 99, la proteasa exhibe uno o varios de los aminoácidos mencionados anteriormente en las respectivas posiciones. Estos aminoácidos pueden causar otras propiedades ventajosas y/o reforzar propiedades ya presentes. En particular, los aminoácidos mencionados anteriormente causan un aumento de la actividad proteolítica y/o la estabilidad de la proteasa en un detergente o agente de limpieza líquido, o en el licor de lavado formado por este detergente o agente de limpieza. Mediante la adición de una proteasa así a un detergente o agente de limpieza líquido, el cual contiene un fosfonato, se obtiene con ello así mismo un detergente líquido particularmente estable al almacenamiento, en particular respecto a su actividad proteolítica remanente después del almacenamiento, en particular después de un periodo de almacenamiento de 1 a 5 semanas, 1 a 4 semanas, 1,5 a 3 semanas y de modo particularmente preferido después de 2 semanas.

Para ello, las posiciones de los aminoácidos son definidas mediante una alineación de la secuencia de aminoácidos de la proteasa que va a ser usada, con la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus*, como se indica en SEQ ID NO. 1. Puesto que la proteasa de *Bacillus lentus* en el estado de la técnica representa una molécula de referencia importante para la descripción de proteasas y de reemplazos de aminoácidos, es ventajoso 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 está determinada por la proteína madura (*mature*). En particular se aplica esta asignación, cuando la secuencia de aminoácidos de la proteasa que va a ser usada comprende un número mayor de radicales aminoácido que la proteasa de *Bacillus lentus* según la 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 va a ser usada de acuerdo con la invención son las que en una alineación coinciden incluso con estas posiciones.

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

Debido a los aminoácidos mencionados previamente, previstos para las respectivas posiciones, pueden resultar otras desviaciones de secuencia frente a SEQ ID NO. 1, en tanto la SEQ ID NO. 1 exhiba otro aminoácido en la respectiva posición. Dependiendo del número de desviaciones secuencia presentes frente a SEQ ID NO.1, surgen por ello diferentes valores máximos de identidad, que una proteasa que va a ser usada de acuerdo con la invención puede exhibir frente a SEQ ID NO. 1, incluso cuando ella debiera en coincidir en todos los aminoácidos restantes con SEQ ID NO. 1. Esta circunstancia debe ser considerada para todas las combinaciones posibles de los aminoácidos propuestos en el caso individual y además depende también de la longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteasa. Por ejemplo, la identidad máxima 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 secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos ocurre mediante una comparación de secuencia. Tal comparación ocurre mediante la asignación de secuencias similares una otra a las secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. Esta comparación de secuencias ocurre preferiblemente con base en el algoritmo BLAST establecido y usado comúnmente 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 sucede en principio porque en las secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos coinciden mutuamente secuencias similares de nucleótidos o aminoácidos. Una asignación tabular de las posiciones en cuestión es denominada como alineación. Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA. Las comparaciones de secuencia (alineaciones), en particular comparaciones múltiples de secuencia, son entregadas 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. Frecuentemente se usan por ejemplo Clustal (véase por ejemplo Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500) o T-Coffee (véase por ejemplo Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) así como BLAST o FASTA para la búsqueda de bancos de datos, o bien programas que se basan en estos programas o algoritmos. En el marco de la presente invención se prefiere emitir comparaciones de secuencia y alineaciones con el programa de computador Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EEUU) con los parámetros establecidos previamente por defecto.

Tal comparación permite una declaración sobre la similitud mutua de las secuencias comparadas. Ella es indicada comúnmente en identidad porcentual, es decir la fracción de nucleótidos o radicales aminoácido idénticos en los mismos o en una alineación de posiciones mutuamente correspondientes. El otro concepto comprendido en la homología involucra en la consideración para secuencias de aminoácidos, reemplazos conservadores de aminoácidos, por consiguiente aminoácidos con actividad química similar, puesto que estos ejercen dentro de la proteína principalmente actividades químicas similares. Por ello la similitud de las secuencias comparadas puede indicarse también como homología porcentual o similitud porcentual. Los datos de identidad y/u homología pueden tener alcance a la totalidad del polipéptido o gen o sólo sobre zonas individuales. Las zonas idénticas u homólogas de diferentes secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos son definidas por ello mediante coincidencias en las secuencias. Tales zonas exhiben frecuentemente funciones idénticas. Pueden ser pequeñas y comprender sólo pocos nucleótidos o aminoácidos. Frecuentemente tales zonas pequeñas ejercen funciones esenciales para la actividad total de la proteína. Por ello, puede ser sensato referirse a coincidencias de secuencia sólo en zonas individuales, dado el caso pequeñas. En tanto no se indique de otro modo, en el presente documento los datos de identidad u homología se refieren sin embargo a la longitud total de la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos indicada en cada caso.

En otra forma de realización de este objetivo de la invención, el detergente o agente de limpieza se caracteriza porque la proteasa comprende secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1, como se indicó previamente y que es obtenida o es obtenible a partir de una proteasa de acuerdo con SEQ ID NO. 1 mediante sustitución individual o múltiple conservadora de aminoácidos. El concepto "sustitución conservadora de aminoácidos" significa el reemplazo (sustitución) de un radical aminoácido por otro radical aminoácido, en el que este reemplazo no conduce a una modificación en la polaridad o carga en la posición del aminoácido reemplazado, por ejemplo el reemplazo de un radical aminoácido apolar por otro radical aminoácido apolar. En el marco de la invención, las sustituciones conservadoras de aminoácidos 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 limpieza se caracteriza además porque su poder de limpieza corresponde por lo menos al de un 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, en el que el poder de limpieza en un sistema de lavado es determinado, el cual contiene un detergente en una dosificación entre 4,0 y 8,0 gramos por litro de licor de lavado así como la proteasa, en el que se usan las proteasas que van a ser comparadas con la misma actividad y el poder de limpieza es determinado contra una o varias de las suciedades sangre-leche/tinta china sobre algodón, huevo entero/pigmento (huevo entero/hollín) sobre algodón, aceite de cacahuete-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 número C-05 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos

- huevo entero/pigmento (huevo entero/hollín) sobre algodón: producto número 10N obtenible de la compañía wfk Testgewebe GmbH; Brüggem-Bracht, Alemania, o producto C-S-37 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos

-aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón: producto número PC-10 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos

-pasto sobre algodón: producto número 164 obtenible de la compañía Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza,

mediante la 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 una dureza entre 15,5 y 16,5°

(dureza alemana).

5 En otra forma de realización de la divulgación, un detergente o agente de limpieza se caracteriza además porque su poder de limpieza corresponde por lo menos al de un detergente o agente de limpieza que contiene una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en 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 se determina el poder de limpieza de un sistema de lavado que contiene un detergente en una dosificación entre 4,0 y 8,0 gramos por litro de licor de lavado así como la proteasa, en el que se usan las proteasas que van a ser comparadas con la misma actividad y el poder de limpieza es determinado contra una o varias de las suciedades sangre- leche/tinta china sobre algodón, huevo entero/pigmento (huevo entero/hollín) sobre algodón, aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón y pasto sobre algodón, en particular frente a una o varias de las suciedades

10 - sangre-leche/tinta china sobre algodón: producto número C-05 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos

15 - huevo entero/pigmento (huevo entero/hollín) sobre algodón: producto número 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, Países Bajos

-aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón: producto número PC-10 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos

20 - pasto sobre algodón: producto número 164 obtenible de la compañía Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza,

mediante la 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 una dureza entre 15,5 y 16,5° (dureza alemana).

25 El detergente para un sistema de lavado es un detergente líquido, que está compuesto preferiblemente como se indica en la tabla 1 (todos los datos en porcentajes en peso):

Tabla 1:

Ingrediente	% en peso
Alcohol graso C ₁₂ -C ₁₈ con 7 EO	6,40
Alquil C ₁₀ -C ₁₃ bencenosulfonato lineal (sal de Na)	5,35
Ácidos grasos C ₁₂ -C ₁₈ (sal de sodio)	2,00
Ácido cítrico (sal de sodio)	1,20
Fosfonato (Dequest® 2066)	0,50
Ácido bórico (sal de sodio)	1,00
Espesante de poliácrlato	0,15
Glicerina	3,00
Etanol	1,00
Antiespumante de silicona	0,01
Perfume	0,70
Colorante, agente conservante	+
Agua	Hasta 100

La dosificación preferida de este detergente líquido está entre 7,0 y 7,5 gramos por litro de licor de lavado, en particular 7,4 gramos por litro de licor de lavado. Respecto a esto se determina el peso del detergente líquido, de

modo que los datos se refieren a su peso. Preferiblemente se lava en un intervalo de valor de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferiblemente entre pH 8 y pH 9.

El grado de blancura, es decir el blanqueo de las suciedades, como medida para el poder de limpieza es determinado preferiblemente con procedimientos ópticos de medición, preferiblemente fotométricos. Un aparato adecuado para ello es por ejemplo el espectrómetro Minolta CM508d. Comúnmente se calibran los aparatos usados para la medición, previamente con un estándar blanco, preferiblemente un estándar blanco incluido.

Mediante el uso de la misma actividad de las respectivas proteasas se asegura que también para una eventual divergencia de la relación de sustancia activa a proteína total (el valor de la actividad específica) se comparan las respectivas propiedades enzimáticas, por consiguiente por ejemplo el poder de limpieza con determinadas suciedades. En general, es válido que una baja actividad específica puede ser compensada mediante adición de una mayor cantidad de proteínas. Los procedimientos para la determinación de las actividades de proteasa son familiares para los expertos en el campo de la tecnología de enzimas y son aplicados por ellos de manera rutinaria. Por ejemplo, tales procedimientos se divulgan en Tenside, volumen 7 (1970), pp. 125-132. Preferiblemente la actividad de proteasa es indicada en PE (unidades de proteasa). Por ejemplo, actividades adecuadas de proteasa ascienden a 2,25, 5 o 10 PE (unidades de proteasa) por ml de licor de lavado. Sin embargo, la actividad de proteasa no es igual a cero.

Numerosas proteasas y en particular subtilisinas están formadas como las denominadas preproteínas, por consiguiente junto con un propéptido y un péptido de señal, en las que la función del péptido de señal consiste comúnmente en garantizar la transferencia al exterior de la proteasa desde la célula que la produce, al periplasma o medio que circunda la célula, y comúnmente el propéptido es necesario para el correcto pliegue de la proteasa. El péptido de señal y el propéptido son por regla general la parte terminal en N de la preproteína. El péptido de señal es escindido del resto de la proteasa, bajo condiciones naturales mediante una señal-peptidasa. A continuación ocurre el pliegue definitivo correcto de la proteasa, promovido por el propéptido. La proteasa está entonces en su forma activa y escinde el propéptido mismo. Después de la escisión del propéptido la proteasa madura (*mature*), 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 (*mature*), es decir las enzimas procesadas después de su preparación, respecto a las preproteínas. Las proteasas pueden además ser modificadas de las células que las produce, después de la preparación de la cadena de polipéptido, por ejemplo mediante conexión de moléculas de azúcar, formilación, introducción de amina, etc. Tales modificaciones son modificaciones posttranscripcionales y pueden, sin embargo no tienen que, ejercer una influencia sobre la función de la proteasa.

Además, la proteasa madura puede recortarse en sus extremos terminales en N y/o terminales en C, de modo que en el detergente o agente de limpieza de acuerdo con la invención está presente una proteasa recortada, por consiguiente un fragmento, respecto 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. Todos los datos de identidad se refieren en este caso a la zona, en la cual coincide el respectivo fragmento en una alineación con SEQ ID NO. 1. Sin embargo, el respectivo fragmento contiene en todo 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 manera ventajosa está presente también una o varias de las otras posiciones descritas previamente y exhibe allí uno o varios de los aminoácidos correspondientes. Además, un fragmento tal tiene actividad proteolítica. un fragmento preferido adicionalmente respecto a esto comprende una 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 coincide 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, considerando los aminoácidos mencionados anteriormente 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 particularmente preferido, el poder de limpieza de un detergente o agente de limpieza líquido con un fragmento tal, corresponde por lo menos al de un 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, determinada como se indicó previamente.

Además, la proteasa presente en un agente puede estar adsorbida sobre material de soporte y/o incorporada en sustancias de envoltura, para protegerla contra la inactivación prematura. En el licor de lavado, por consiguiente bajo condiciones de aplicación, la proteasa es liberada entonces y puede desplegar su efecto proteolítico.

En otro objeto de la invención, un detergente o agente de limpieza líquido está caracterizado porque 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 o SEQ ID NO. 3;

b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3, en la que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegido de entre el grupo consistente en:

- 5 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 61R),
- iv. ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
- v. prolina en la posición 188 (188P),
- 10 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 (211D, 211E o 211G),
- ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);
- (b) un fosfonato.

15 Estas proteasas son usadas de modo muy particularmente preferido en un detergente o agente de limpieza líquido. Son obtenidas partiendo de SEQ ID NO. 1 mediante la sustitución del aminoácido arginina en la posición 99 por el aminoácido ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D) en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1. Estas secuencias de aminoácidos están indicadas en el protocolo de secuencia como SEQ ID NO. 2 y SEQ ID NO. 3. Además, éstas proteasas, adicionalmente al aminoácido previsto para la posición 99, pueden exhibir uno o varios de los aminoácidos ilustrados previamente en las posiciones 3, 4, 61, 154, 188, 193, 199 y 211, asignar 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 causan también para estas proteasas otras propiedades ventajosas y/o refuerzan más las propiedades ya presentes. En particular provocan un aumento de la actividad proteolítica y/o la estabilidad de la proteasa en un detergente o agente de limpieza líquido o en el licor de lavado formado por este detergente o agente de limpieza. Todas las realizaciones precedentes - en tanto sean aplicables - son válidas de modo correspondiente para estas proteasas particularmente preferidas.

Se divulga además un detergente o agente de limpieza líquido que comprende:

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

- 30 a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con 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 en por lo menos una posición respecto a 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 elegido de entre el grupo consistente en:
- 35 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 61R),
- 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),
- 40 vii. isoleucina en la posición 199 (199I),
- viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211D, 211E o 211G),
- ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

(b) un fosfonato.

Estas proteasas son usadas de modo muy particularmente preferido en un detergente o agente de limpieza líquido. Son obtenidas partiendo de SEQ ID NO. 1 mediante la sustitución del aminoácido arginina en la posición 99 por 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 están indicadas en el protocolo de secuencia como SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y SEQ ID NO. 8. Además, éstas proteasas pueden exhibir adicionalmente al aminoácido previsto para posición 99, uno o varios de los aminoácidos ilustrados previamente en las posiciones 3, 4, 61, 154, 188, 193, 199 y 211, asignar 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 para estas proteasas otras propiedades ventajosas y/o refuerzan más las propiedades ya presentes. En particular provocan un aumento de la actividad proteolítica y/o la estabilidad de la proteasa en un detergente o agente de limpieza líquido o en el licor de lavado formado por este detergente o agente de limpieza. De modo correspondiente, todas las realizaciones precedentes - en tanto sean aplicables - son válidas para estas proteasas particularmente preferidas.

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 fosfatos 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 de la fórmula tautomérica estable del ácido fosforoso con un equivalente de base (primaria) o dos (secundaria), 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 la que los radicales alquilo o arilo pueden exhibir 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 estos fosfonatos son solubles en agua. Algunos fosfonatos técnicamente importantes portan además grupo(s) amino del tipo $NR-(CH_2)_x-PO(OH)_2$ (R = alquilo, arilo o H). Algunos de estos aminofosfonatos tienen similitudes estructurales con formadores de complejo como EDTA, NTA o DTPA y tienen una función similar.

En el marco de la presente invención, entre los fosfonatos particularmente preferidos se cuentan en particular organofosfonatos como por ejemplo ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido aminotri(metilenfosfónico) (ATMP, también denominado como aminotris(ácido metilenfosfónico) o ácido **nitrolotris**(metilenfosfónico) (NTMP)), ácido dietilentriamino-penta(metilenfosfónico) (DTPMP o DETPMP o DTPNT), ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP, también denominado como etilendiaminotetra(ácido metilenfosfónico) así como ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBS-AM, también denominado como ácido fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico o ácido 3-carboxi-3-fosfonoadípico), que son usados principalmente en forma de sus sales de amonio o metal alcalino. Se prefieren particularmente dietilentriaminopenta(metilenfosfonatos) de sodio, en particular para detergentes en el sentido de la presente invención, y/o ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), en particular para detergentes de acuerdo con la invención para vajillas y entre ellos en particular detergentes para lavadoras automáticas de vajillas. Tales fosfonatos son obtenibles por ejemplo bajo el nombre comercial Dequest® 2066 y Dequest® 2010 en cada caso de la compañía Thermphos).

En una forma preferida de realización de la invención, el detergente o agente de limpieza se caracteriza porque el fosfonato está presente en una cantidad de 0,01 a 4 % en peso. Otras cantidades preferidas del fosfonato presente en el detergente o agente de limpieza son de 0,01 a 3 % en peso, de 0,01 a 2,5 % en peso, de 0,02 a 2,4 % en peso, de 0,02 a 2 % en peso, de 0,03 a 1,5 % en peso o de 0,05 a 1 % en peso.

En una forma de realización de la invención, la proteasa en está presente en un detergente o agente de limpieza preferiblemente en una cantidad de 1×10^{-8} a 5 por ciento en peso, referida a la proteína activa. Con creciente preferencia, la proteasa está presente en el agente en una cantidad de 0,001 a 5 % en peso, más preferiblemente de 0,01 a 5 % en peso, todavía más preferiblemente de 0,05 a 4 % en peso y de modo particular preferiblemente de 0,075 a 3,5 % en peso. La concentración de proteína puede ser determinada con ayuda de procedimientos conocidos, por ejemplo el procedimiento BCA (ácido bicínico; ácido 2,2'-biquinolí-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).

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

i. sustancia aniónica y/o polianiónica y/o

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 adicionalmente el poder de limpieza de detergentes y agentes de limpieza, en particular de detergentes o agentes de limpieza líquidos que contienen proteasas, en particular aquellos como se describió previamente, en particular a temperaturas comparativamente bajas, en 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.

Las sustancias indicadas previamente bajo i. son sustancias aniónicas o polianiónicas, es decir estas sustancias portan por lo menos una y preferiblemente varias cargas negativas. Preferiblemente es un polímero con por lo menos un monómero con carga negativa, preferiblemente con monómeros con varias cargas negativas. Por ello, de acuerdo con la invención preferiblemente este polímero es un polímero con carga negativa. Se prefieren por ejemplo ácidos orgánicos poliméricos o sus sales, en particular poliacrilatos y/o ácidos poli-sacáricos y/o copolímeros de poliacrilato y/o copolímero de poliazúcares. Respecto a esto, otros compuestos preferidos son poliacrilsulfonatos o policarboxilatos y sus sales, copolímeros o sales de los copolímeros.

Son ejemplos de sustancias preferidas de modo particular 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 Thermfos), ácido alginico, ácido poli-2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfónico, sal de sodio de ácido poli-4-estireno sulfónico -co-maleico, sal de sodio de ácido acrílico, sal de sodio de ácido polimetacrílico, ácido poli-metil vinil eter-alt maleico o sal de sodio de ácido polivinilsulfónico.

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 con carga positiva. Son ejemplos de compuestos preferidos respecto a esto las sales de las poliaminas, polietileniminas o sus copolímeros, sales de las polialilaminas, sales de compuestos de polidialildimetilamonio o compuestos de poli(acrilamido-co-dialildimetilamonio).

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. Respecto a esto se prefieren por ejemplo polivinilalcoholes, por ejemplo aquellos que están disponibles bajo el nombre comercial Mowiol (compañía Kremer Pigmente GmbH & Co. KG).

En este pasaje se hace referencia expresa 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 puede exhibir uno o varios grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo. Una sustancia así puede pertenecer entonces a los grupos i. y iii. Así mismo, un polímero catiónico, que exhibe uno o varios grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo, puede pertenecer a los grupos ii. y iii.

Así mismo, en el marco de la presente invención se pueden usar derivados de las sustancias mencionadas previamente, como pertenecientes a i., ii. o iii.. En el marco de la presente invención se entiende por un derivado una sustancia tal, que partiendo de una de las sustancias mencionadas previamente, es modificada químicamente, por ejemplo mediante la transformación de una cadena lateral o mediante enlace covalente de otro compuesto, a la sustancia. Un compuesto tal puede ser por ejemplo un compuesto 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, formilada en N, acetilada en N o contener metilo, formilo, etilo, acetilo, t-butilo, anisilo, bencilo, trifluoroacetilo, N-hidroxisuccinimido, t-butiloxicarbonilo, benzoilo, 4-metilbencilo, tioanizilo, 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-croman-6-sulfonilo. Así mismo, se entiende por un derivado el enlace covalente o no covalente de la sustancia con un vehículo macromolecular, exactamente como una inclusión no covalente en estructuras macromoleculares de jaula adecuadas. También pueden tomarse acoplamientos con otros compuestos macromoleculares como por ejemplo polietilenglicol. Otras modificaciones químicas preferidas son la modificación de uno o varios de los grupos químicos -COOH, -OH, =NH, -NH₂ -SH hasta -COOR, -OR, -NHR, -NR₂, -NHR, -NR, -SR; en los que:

R es -CH=CH-R², -C=C-R², -C(R²)=CH₂, -C(R²)=C(R³), -CH=NR², -C(R₂)=N-R³, un sistema anular de 4-7 átomos 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 los que

- 5 - R¹ es H, -R, -NO₂, -CN, sustituyente halogenuro, -N³, alquilo -C₁₋₈, -(CH₂)_nCO₂R², alqueno -C₂₋₈-CO₂R², -O(CH₂)_nCO₂R², -C(O)NR²R³, -P(O)(OR²)₂, tetrazol-5-il sustituido con alquilo, arilo -(CH₂)_nO(CH₂)_n, -NR²R³, -(CH₂)_nOR², -(CH₂)_nSR², -N(R²)C(O)R³, -S(O₂)NR²R³, -N(R²)S(O₂)R³, -(CHR²)_n NR²R³, -C(O)R³, (CH₂)_n N(R³)C(O)R³, -N(R²)CR²R³, ciclo alquilo (CH₂)_n- sustituido o no sustituido, fenilo o ciclo sustituido o no sustituido con (CH₂)_n; en los que n es un número entero mayor a 1;
- 10 - R² es H, sustituyente halogenuro, alquilo, -haloalquilo, -(CH₂)_n-fenilo, -(CH₂)₁₋₃-bifenilo, -(CH₂)₁₋₄-Ph-N(SO₂-alquilo C₁₋₂)₂, -CO(CHR¹)_n-OR¹, heterociclo -(CHR¹)_n-, -(CHR¹)_n-NH-CO-R¹, -(CHR¹)_n-NH-SO₂R¹, -(CHR¹)_n-Ph-N(SO₂-alquilo C₁₋₂)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, alquilo -(CHR¹)_n-O-, alquilo -(CHR¹)_n-O-(CH₂)_n-O-, alquilo-(CHR¹)_n-S-, alquilo-(CHR¹)_n-S(O)-, alquilo-(CHR¹)_n-S(O₂)-, (CHR¹)_n-S(O₂)-NHR³-, -(CHR³)_n-N³, -(CHR³)_nNHR⁴, una cadena alqueno C₂ a C₈ con 1 a 5 enlaces dobles, una cadena alqueno C₂ a C₈ con 1 a 5 enlaces triples, heterociclo -(CHR³)_n sustituido o no sustituido, cicloalquilo saturado o no saturado -(CHR³)_n sustituido o no sustituido; en los que n es un número entero mayor a 1 y R¹ y R³ pueden ser iguales o diferentes;
- 15 - R³ es H, -OH, -CN, alquilo sustituido, alqueno - C₂ a C₈, cicloalquilo sustituido o no sustituido, -N(R¹)R², heterociclo o heterobicyclo C₅ a C₇ de 4 a 7 átomos de C saturado o no saturado, -NR¹, -NR², -NR¹ R² consistente en un heterociclo o un heterobicyclo saturado o no saturado de 4 a 7 átomos de C;
- R⁴ es H, -(CH₂)_nOH, -C(O)OR⁵, -C(O)SR⁵, -(CH₂)_nC(O)NR⁶R⁷, -O-C(O)-O-R⁶, un aminoácido o un péptido; en los que n es un número entero entre 0 y 4;
- R⁵ es H;
- 20 - R⁶ es -C(R⁷)-(CH₂)_n-O-C(O)-R⁸, -(CH₂)_n-C(R⁷)-O-C(O)R⁸, -(CH₂)_n-C(R⁷)-O-C(O)-O-R⁸, o -C(R⁷)-(CH₂)_n-O-C(O)-O-R⁸; en los que n es un número entero entre 0 y 4; y
- R⁷ y R⁸ 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 CH₂CO₂, en los que R⁷ y R⁸ pueden ser iguales o diferentes.
- 25 De acuerdo con la invención, es posible además usar todas las combinaciones posibles de las sustancias mencionadas previamente como pertenecientes a i., ii. o iii. y/o sus derivados.
- 30 En una forma preferida de realización de la invención, el detergente o agente de limpieza líquido, es usado como tal o después de dilución con agua, para la limpieza de textiles y/o superficies duras. Una dilución así puede ser fabricada fácilmente, para lo cual se diluye una cantidad medida del agente en otra cantidad de agua, en determinadas relaciones de peso de agente : agua y opcionalmente se agita esta dilución para asegurar una distribución homogénea del agente en el agua. Son posibles relaciones de peso o de volumen de las diluciones de 1:0 agente : agua a 1:10.000 o 1:20.000 de agente : agua, preferiblemente de 1:10 a 1:2.000 de agente : agua.
- 35 Como detergente o agente de limpieza líquido pueden servir al respecto todas las formas de dosificación líquidas o fluidas. En el sentido del presente documento, "fluidos" son al respecto los agentes, que pueden ser vertidos y pueden exhibir viscosidades de hasta varios 10.000 mPas. La viscosidad puede ser medida con procedimientos estándar (por ejemplo viscosímetro Brookfield LVT-11 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 valores entre 120 a 3.000 mPas. En el marco de la presente invención, un detergente o agente de limpieza líquido puede por ello también tener forma de gel o de pasta, pueden estar presente como soluciones o
- 40 suspensiones homogéneas, así como por ejemplo ser atomizables o estar confeccionados en otras formas corrientes de administración. Entre los detergentes se cuentan todos los tipos imaginables de detergente, en particular detergentes para textiles, alfombras o fibras naturales. Pueden ser previstos para la aplicación manual y/o también para la automática. Entre los detergentes se cuentan además agentes para detergentes, que pueden ser dosificados al verdadero detergente en el lavado manual o automático de textiles, para alcanzar un efecto
- 45 adicional. Entre los agentes para limpieza se cuentan, así mismo agentes que ocurren en todas las formas mencionadas de administración, para la limpieza y/o desinfección de superficies duras, lavado manual y automático de vajillas, limpiadores de alfombras, abrasivos, limpiadores de vidrio, aromatizantes para sanitarios, etc.. Los agentes para tratamiento previo y posterior son finalmente por un lado aquellos agentes con los cuales la pieza de ropa es puesta en contacto antes del verdadero lavado, por ejemplo para disolver suciedades persistentes, por el otro lado aquellos que en una etapa siguiente al verdadero lavado el textil imparten a la pieza de lavado otras propiedades deseables como agradable sensación al tacto, ausencia de arrugas o baja carga
- 50 estática. Entre los últimos agentes mencionados se cuentan entre otros los suavizantes para textiles. Son agentes desinfectantes por ejemplo agentes desinfectantes para manos, agentes desinfectantes para superficies y agentes desinfectantes para instrumentos, que pueden ocurrir así mismo en las formas mencionadas de administración.

En otra forma de realización de la invención, el detergente o agente de limpieza se caracteriza porque comprende por lo menos otro aditivo, en particular uno que es elegido de entre el grupo consistente en tensioactivo, sustancia estructural (agente de relleno), compuesto de perácido, activador de blanqueo, alcohol, ácido, inhibidor de agrisamiento, aclarador óptico, inhibidor de espuma, sal soluble en agua, espesante, agente alcalino y/o base volátil, agente que imparte carácter hidrofílico así como combinaciones de ellos.

Como tensioactivo(s) puede(n) usarse tensioactivo(s) aniónicos, no iónico, zwitteriónicos y/o anfóteros. Desde el punto de vista de la aplicación técnica, se prefieren mezclas de tensioactivos aniónicos y no iónicos. El contenido total de tensioactivo del detergente o agente de limpieza líquido está 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 de limpieza líquido.

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

Como tensioactivos no iónicos se usan preferiblemente alcoholes, ventajosamente etoxilados, en particular primarios 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 ramificado en la segunda posición con metilo o puede contener radicales lineales y ramificados con metilo en la mezcla, así como están presentes comúnmente en radicales oxoalcohol. En particular sin embargo se prefieren etoxilatos de alcohol con radicales lineares de alcoholes de origen nativo con 12 a 18 átomos de C, por ejemplo alcohol de coco, de palma, de grasa de sebo u oleilalcohol, y en promedio 2 a 8 EO por mol de alcohol. A los alcoholes preferidos etoxilados pertenecen por ejemplo alcoholes C₁₂₋₁₄ con 3 EO, 4 EO o 7 EO, alcohol C₉₋₁₁ con 7 EO, alcoholes C₁₃₋₁₅ con 3 EO, 5 EO, 7 EO o 8 EO, alcoholes C₁₂₋₁₈ con 3 EO, 5 EO o 7 EO y mezclas de estos, como mezclas de alcohol C₁₂₋₁₄ con 3 EO y alcohol C₁₂₋₁₈ con 7 EO. Los grados indicados de etoxilación representan valores estadísticos promedio, que para un producto especial pueden ser un número entero fraccionario. Los etoxilatos preferidos de alcohol exhiben una distribución homóloga estrecha (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 el 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 en la molécula juntos los grupos EO y PO. Además son adecuados también una mezcla de un alcohol graso (más fuerte) ramificado etoxilado y un alcohol graso etoxilado no ramificado, como por ejemplo una mezcla de un alcohol graso C₁₆₋₁₃ con 7 EO y 2-propilheptanol con 7 EO. En particular el detergente, agente de limpieza, agente de tratamiento posterior o agente auxiliar de lavado contiene como tensioactivo no iónico preferiblemente un alcohol graso C₁₂₋₁₈ con 7 EO o un oxoalcohol C₁₃₋₁₅ con 7 EO.

El contenido de tensioactivo no iónico en el detergente o agente de limpieza es preferiblemente de 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 del detergente o agente de limpieza.

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

Al respecto, como tensioactivos del tipo sulfonato entran en consideración preferiblemente alquil C₉₋₁₃-bencenosulfonatos, olefinsulfonatos, es decir mezclas de alquen- e hidroxialcanosulfonatos así como disulfonatos, como se obtienen por ejemplo a partir de monoolefinas C₁₂₋₁₈ con enlaces dobles terminales o internos, mediante sulfonación con trióxido de azufre gaseoso y subsiguiente hidrólisis alcalina o ácida del producto de sulfonación. Son adecuados también alcano C₁₂₋₁₈ sulfonatos 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.

Como alqu(en)ilsulfatos se prefieren las sales alcalinas y en particular de sodio del semiéster de ácido sulfúrico de alcoholes grasos C_{12-C₁₈}, por ejemplo de alcohol de grasa de coco, alcohol de grasa de sebo, lauril-, miristil-, cetil- o estearilalcohol o los oxoalcoholes C_{10-C₂₀} y los semiésteres de alcoholes secundarios de estas longitudes de cadena. De interés para el lavado técnico, se prefieren los alquilsulfatos C_{12-C₁₆} y alquilsulfatos C_{12-C₁₅} así como alquilsulfatos C_{14-C₁₅}. También son tensioactivos aniónicos adecuados los 2,3 alquilsulfatos.

También son adecuados los monoésteres de ácido sulfúrico de los alcoholes C₇₋₂₁ de cadena recta o ramificados, etoxilados con 1 a 6 mol de óxido de etileno, como alcoholes C₉₋₁₁ ramificados con metilo en posición 2, con en promedio 3,5 mol de óxido de etileno (EO) o alcoholes grasos C₁₂₋₁₈ con 1 a 4 EO.

También son tensioactivos aniónicos preferidos los jabones. Son adecuados jabones de ácidos grasos saturados e insaturados, como las sales de los ácidos láurico, mirístico, palmítico, esteárico, erúxico hidrogenado y behénico

así como en particular mezclas de jabones derivados de ácidos grasos naturales, por ejemplo ácidos grasos de coco, de núcleo de palma, de aceite de oliva o de grasa de sebo.

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 aniones contrarios preferidos para los tensioactivos aniónicos son también las formas protonadas de colina, trietilamina o metiletilamina.

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

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

Por ejemplo, son sustancias estructurales orgánicas que pueden estar presentes en el detergente o agente de limpieza, los ácidos policarboxílicos que se pueden usar 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, ácido sacárico, ácidos aminocarboxílicos, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido metilglicindiacético (MGDA) y sus derivados así como mezclas de estos. Son sales preferidas las sales de los ácidos policarboxílicos como ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido tartárico, ácido sacárico y mezclas de estos.

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

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, de este grupo pueden preferirse 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.

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

Sin embargo en detergentes o agentes de limpieza líquidos se usan preferiblemente sustancias estructurales solubles, como por ejemplo ácido cítrico, o acrilpolímeros con una masa molar de 1.000 a 5.000 g/mol.

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. Se usan cantidades cercanas al límite superior mencionado, preferiblemente en agentes en forma de pasta o líquida, en particular que contienen agua.

Como compuestos de peroxígeno adecuados para el uso en agentes en el sentido de la invención entran en consideración en particular perácidos orgánicos o bien sales de perácido de ácidos orgánicos, como ácido ftalimidopercaprónico, ácido perbenzoico o sales del ácido diperdodecanodioico, peróxido de hidrógeno y sales inorgánicas que bajo las condiciones de lavado liberan peróxido de hidrógeno, a las cuales pertenecen perborato, percarbonato, persilicato y/o persulfato como carboato. En caso que un agente contenga compuestos de peroxígeno, estos están presentes en cantidades de preferiblemente hasta 50 % en peso, en particular de 5 % en peso a 30 % en peso. La adición de pequeñas cantidades de estabilizantes de blanqueo conocidos, como por ejemplo de fosfonatos, boratos o metaboratos y metasilicatos así como sales de magnesio, como sulfato de magnesio, puede ser conveniente.

Como activadores de blanqueo pueden usarse compuestos que bajo condiciones de perhidrólisis dan como resultado ácidos peroxocarboxílicos alifáticos con preferiblemente 1 a 10 átomos de C, en particular 2 a 4 átomos de C, y/o dado el caso ácido perbenzoico sustituido. Son adecuadas las sustancias que portan grupos O- y/o N-acilo del número mencionado de átomos de C y/o dado el caso grupos benzoilo sustituidos. Se prefieren alquilendiaminas aciladas varias veces, en particular tetraacetiletildiamina (TAED), derivados acilados de triazina, en particular 1,5- diacetil-2,4-dioxohexahidro-1,3,5-triazina (DADHT), glicolurilos acilados, en particular tetraacetilglicolurilo (TAGU), N-acilimididas, en particular N-nonanoilsuccinimida (NOSI), fenolsulfonatos acilados, en particular n-nonanoil- o isononanoiloxibencenosulfonato (n- o iso-NOBS), anhídridos de ácidos carboxílicos, en

particular anhídrido ftálico, alcoholes acilados varias veces, en particular triacetina, etilenglicoldiacetato, 2,5-diacetoxi-2,5-dihidrofurano y enolésteres así como sorbitol y manitol acetilados o sus mezclas descritas (SORMAN), derivados acilados de azúcar, en particular pentaacetilglucosa (PAG), pentaacetilfructosa, tetraacetilxilosa y octaacetilactosa así como glucamina y gluconolactona acetiladas, dado el caso lactama N-alquilada, y/o N-acilada, por ejemplo N-benzoilcaprolactama. Así mismo, se prefieren los acilacetales y las acilactamas hidrofílicas sustituidas. También pueden usarse combinaciones de activadores convencionales de blanqueo. Tales activadores de blanqueo pueden estar presentes, en particular en presencia del agente de blanqueo que libera peróxido de hidrógeno mencionado anteriormente, en el intervalo corriente de cantidad, preferiblemente en cantidades de 0,5 % en peso a 10 % en peso, en particular 1 % en peso a 8 % en peso, referidas a la totalidad del agente, sin embargo en su ausencia se prefiere mucho el uso de ácidos percarboxílicos como único agente de blanqueo.

Adicionalmente a los activadores convencionales de blanqueo o en su lugar, pueden estar presentes como los denominados catalizadores de blanqueo, también sulfoniminas y/o sales de metales de transición o complejos de metales de transición que refuerzan el blanqueo.

Los detergentes o agentes de limpieza son líquidos y como solvente principal contienen preferiblemente agua. Aparte de ellos, al detergente o agente de limpieza pueden añadirse solventes no acuosos. Los solventes no acuosos comprenden alcoholes monovalentes o polivalentes, alcanolaminas o glicoléteres, en tanto sean miscibles en agua en el intervalo indicado de concentración. Preferiblemente se usan los solventes 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, di-isopropilenglicolmonometiléter, di-isopropilenglicolmonoetiléter, metoxitriglicol, etoxitriglicol, butoxitriglicol, 1-butoxi-2-propanol, 3-metil-3-metoxibutanol, propilen-glicol-t-butiléter, di-n-octiléter así mezclas de estos solventes. Sin embargo, se prefiere que el detergente o agente de limpieza contenga como solvente no acuoso un poliol. El poliol puede comprender en particular glicerina, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, etilenglicol, dietilenglicol y/o dipropilenglicol. En particular, el detergente o agente de limpieza contiene una mezcla de un poliol y un alcohol monovalente. Los solventes no acuosos pueden ser usados en el detergente o agente de limpieza en cantidades entre 0,5 y 15 % en peso, sin embargo preferiblemente por debajo de 12 % en peso.

Para el ajuste de un valor de pH deseado, el cual no resulta en sí mismo por la mezcla de los componentes restantes, los agentes pueden contener ácidos compatibles con el sistema y 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 hidróxidos de amonio o alcalinos. Tales reguladores de pH están presentes en el agente en cantidades preferiblemente de no más de 20 % en peso, en particular de 1,2 % en peso a 17 % en peso.

Los inhibidores de agrisamiento tienen la tarea de mantener suspendida en el licor la suciedad disuelta de la fibra textil. Para ello son adecuados los coloides solubles en agua, principalmente de naturaleza orgánica, por ejemplo almidón, cola, gelatina, sales de ácidos etercarboxílicos o ácidos etersulfónicos del almidón o la celulosa o sales de ésteres ácidos de ácido sulfúrico de celulosa o almidón. También son adecuados para este propósito poliamidas solubles en agua que contienen grupos ácidos. Además se usan otros derivados de almidón diferentes de los mencionados anteriormente, por ejemplo aldehído-almidón. Preferiblemente se usan éteres de celulosa, como carboximetilcelulosa (sal de sodio), metilcelulosa, hidroxialquilcelulosa y éteres mixtos, como metilhidroxietilcelulosa, metil-hidroxipropilcelulosa, metilcarboximetilcelulosa y sus mezclas, por ejemplo en cantidades de 0,1 a 5 % en peso, referidas al agente.

Los agentes para el lavado textil pueden contener como aclarador óptico por ejemplo derivados del ácido diaminoestilbendisulfónico o sus sales de metales alcalinos, aunque para el uso como agentes para el lavado de color preferiblemente están libres de aclaradores ópticos. Son adecuadas por ejemplo sales del ácido 4,4'-bis(2-anilino-4-morfolino-1,3,5-triazinil-6-amino)estilben-2,2'-disulfónico o compuestos constituidos de modo similar, que en lugar del grupo morfolino portan un grupo dietanolamino, un grupo metilamino, un grupo anilino o un grupo 2-metoxietilamino. Además, pueden estar presentes aclaradores del tipo de los difenilestirilos sustituidos, por ejemplo las sales alcalinas del 4,4'-bis(2-sulfoestiril)-difenilo, 4,4'-bis(4-cloro-3-sulfoestiril)-difenilo, o 4-(4-cloroestiril)-4'-(2-sulfoestiril)-difenilo. También pueden usarse mezclas de los aclaradores ópticos mencionados anteriormente.

En particular en el uso de procedimientos automáticos puede ser ventajoso añadir inhibidores de espuma a los agentes. Como inhibidores de espuma son adecuados por ejemplo jabones de origen natural o sintético, que exhiben una elevada fracción de ácidos grasos C₁₈-C₂₄. Son inhibidores de espuma de tipo no tensioactivo adecuados por ejemplo organopolisiloxanos y sus mezclas con ácido silícico microfino, dado el caso silanizado,

así como parafinas, ceras, ceras microcristalinas y sus mezclas con ácido silícico silanizado o bisalquilendiamidas de ácidos grasos. Con ventaja se usan también mezclas de diferentes inhibidores de espuma, por ejemplo aquellas de siliconas, parafinas o ceras.

5 Preferiblemente los inhibidores de espuma, en particular inhibidores de espuma que contienen silicona y/o parafina, están unidos a una sustancia soporte granular soluble o dispersable en agua. Al respecto, en particular se prefieren mezclas de parafinas y biestearilendiamida.

10 Un agente en el sentido de la invención 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 se pueden usar son elegidas preferiblemente de entre el grupo que comprende halogenuros, sulfatos, sulfitos, carbonatos, hidrogenocarbonatos, nitratos, nitritos, fosfatos y/u óxidos de los metales alcalinos, de metales alcalinotérreos, de aluminio y/o de los metales de transición, incoloros solubles en agua; además, se pueden usar sales de amonio. Al respecto, se prefieren particularmente halogenuros y sulfatos de los metales alcalinos; por ello, preferiblemente la sal inorgánica es elegida de entre el grupo consistente en cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, sulfato de potasio así como mezclas de ellos. Son sales orgánicas que se pueden usar por ejemplo sales incoloras, solubles en agua de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio, aluminio y/o metales de transición de los ácidos carboxílicos. Se prefieren las sales elegidas de entre el grupo que comprende formiato, acetato, propionato, citrato, malato, tartrato, succinato, malonato, oxalato, lactato así como mezclas de ellos.

20 Para el espesamiento, un agente en el sentido de la invención puede contener además uno o varios agentes espesantes. Preferiblemente el agente espesante es elegido de entre el grupo que comprende xantano, guar, carragenina, agar-agar, gellan, pectina, harina de algarroba y mezclas de ellos. Estos compuestos también son espesantes efectivos en presencia de sales inorgánicas. En una forma de realización particularmente preferida, el detergente o agente de limpieza contiene como agente espesante xantano, puesto que el xantano es un espesante efectivo también 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.

30 De modo alternativo o complementario, como espesantes pueden usarse también (co)polímeros de ácido (met)acrílico. Los (co)polímeros adecuados de ácido acrílico y metacrílico comprenden por ejemplo los homopolímeros entrecruzados de alto peso molecular de ácido acrílico con un polialquenilpoliéter, en particular un aliléter de sacarosa, pentaeritritol o propileno, (denominación INCI de acuerdo con "International dictionary of Cosmetic Ingredients" de la "The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA)": carbómero), que son denominados también 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 (INCI copolímero de acrilatos) simples formados preferiblemente con alcanoles C₁₋₄, que son obtenibles por ejemplo bajo el nombre comercial Aculyn®, Acusol® o Tega® Polymer; (ii) copolímeros entrecruzados de alto peso molecular de ácido acrílico, a los cuales pertenecen por ejemplo los copolímeros de alquilacrilatos C₁₀₋₃₀ entrecruzados con un aliléter de sacarosa o de pentaeritritol, con uno o varios monómeros del grupo del ácido acrílico, ácido metacrílico y sus ésteres (INCI polímero cruzado de acrilatos/alquil C₁₀₋₃₀ acrilato) simples, preferiblemente formados con alcanoles C₁₋₄ y que son obtenibles bajo el nombre comercial Carbopol®. Otros polímeros adecuados son (co)polímeros de ácido metacrílico des tipo Sokalan®.

45 Puede preferirse que el detergente o agente de limpieza contenga un (co)polímero de ácido (met)acrílico en combinación con otro agente espesante, preferiblemente xantano. El detergente o agente de limpieza 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 limpieza. Al respecto, la cantidad de agente espesante usado depende del tipo de agente espesante y del grado deseado de espesamiento.

Un agente correspondiente puede contener además álcalis volátiles. Como tales, se usan amoníaco y/o alcanolaminas, que pueden tener en la molécula hasta 9 átomos de C.

50 Como alcanolaminas se prefieren las etanolaminas y de estas a su vez la monoetanolamina. El contenido de amoníaco y/o alcanolamina es preferiblemente 0,01 a 2 % en peso; de modo particularmente preferido se usa amoníaco. Al respecto, pueden estar presentes también pequeñas cantidades de bases. Las bases preferidas provienen del grupo de los hidróxidos y carbonatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, en particular los hidróxidos de metales alcalinos, de los cuales se prefieren particularmente hidróxido de potasio y sobre todo hidróxido de sodio.

55 Un agente correspondiente puede contener también un agente que da carácter hidrofílico. Dentro de ellos, en el

- marco de la presente invención, se entienden agentes para dar a las superficies carácter hidrofílico. Para dar carácter hidrofílico son adecuados en particular los soles coloidales de sílice, en los cuales el dióxido de silicio está presente preferiblemente en forma de nanopartículas. Los soles coloidales de sílice en forma de nanopartículas, en el sentido de esta invención, son dispersiones estables de dióxido de silicio SiO₂ amorfo en forma de partículas con tamaños de partícula en el intervalo de 1 a 100 nm. Al respecto, los tamaños de partícula están en el intervalo 3 a 50 nm, de modo particularmente preferido 4 a 40 nm. Un ejemplo de un sol de sílice que es adecuado para ser usado en el sentido de esta invención, es el sol de sílice obtenible bajo el nombre comercial Bindzil® 30/360 de la compañía Akzo, con un tamaño de partícula de 9 nm.
- Otros soles adecuados de sílice son Bindzil® 15/500, 30/220, 40/200 (Akzo), Nyacol® 215, 830, 1430, 2034DI así como Nyacol® DP5820, DP5480, DP5540 etc. (Nyacol Products), Levasil® 100/30, 100F/30, 100S/30, 200/30, 200F/30, 300F/30, VP 4038, VP 4055 (H.C. Starck/ Bayer) o también CAB-O-SPERSE® PG 001, PG 002 (dispersiones acuosas de CAB-O-SIL®, Cabot), Quartron PL-1, PL-3 (FusoChemical Co.), Kostrosol 0830, 1030, 1430 (Chemiewerk Bad Köstritz). Los soles de sílice usados pueden ser también sílice con modificación superficial, que fue tratada con aluminato de sodio (sílice modificada con alúmina).
- Aparte de ello, para la transformación de las superficies en hidrofílicas se usan también determinados polímeros. Como polímeros que dan carácter hidrofílico son adecuados en particular polímeros anfóteros, por ejemplo copolímeros de ácido acrílico o metacrílico y MAPTAC, DADMAC u otro compuesto de amonio cuaternario polimerizable. Además pueden usarse también copolímeros con AMPS (ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico). Otros polímeros adecuados son polietersiloxanos, por consiguiente copolímeros de polimetilsiloxanos con segmentos de óxido de etileno-óxido de propileno. Así mismo, se pueden usar polímeros de acrílico, copolímeros de ácido maleico, y poliuretano con unidades de PEG (polietilenglicol). Son obtenibles comercialmente por ejemplo polímeros adecuados bajo el nombre comercial Mirapol Surf-S 100, 110, 200, 210, 400, 410, A 300, A 400 (Rhodia), Tegopren 5843 (Goldschmidt), Sokalan CP 9 (BASF) o Polyquart Amfo 149 (Cognis).
- Comúnmente se optimizan los ingredientes que van a ser elegidos, como también las condiciones bajo las cuales son usados de acuerdo con la invención, como por ejemplo temperatura, valor de pH, fuerza iónica, relación redox o influencias mecánicas.
- Los agentes líquidos o pastosos en forma de soluciones corrientes que contienen solvente son por regla general fabricados mediante mezcla simple de los ingredientes, los cuales pueden ser añadidos sin solvente o como solución, en un mezclador automático.
- Los detergentes o agentes de limpieza en el sentido de la invención pueden contener exclusivamente una proteasa como se describió. De modo alternativo pueden contener también otras enzimas hidrolíticas u otras enzimas en una concentración conveniente para la eficacia del agente. Con ello, en el sentido de la invención, el agente puede comprender una o varias otras enzimas, en las que en principio se pueden usar todas las enzimas establecidas en el estado de la técnica para este propósito. Como otras enzimas se pueden usar preferiblemente todas las enzimas que pueden desplegar una actividad catalítica en el agente de acuerdo con la invención, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasas, xantanasas, β-glucosidasa, carraginasas, perhidrolasa, oxidasa, oxidoreductasa o una lipasa, así como preferiblemente sus mezclas. Estas enzimas son en principio de origen natural; partiendo de las moléculas naturales, están disponibles para el uso en detergentes y agentes de limpieza variantes mejoradas, que son usadas de modo correspondiente preferiblemente.
- Los agentes en el sentido de la invención contienen enzimas preferiblemente en cantidades totales de 1x10⁻⁸ a 5 por ciento en peso, referidas a la proteína activa. Preferiblemente, las enzimas están presentes en el agente de 0,001 a 5 % en peso, más preferiblemente de 0,01 a 5 % en peso, aún más preferiblemente de 0,05 a 4 % en peso y de modo particular preferiblemente de 0,075 a 3,5 % en peso, en las que cada enzima contenida puede estar presente en las mencionadas relaciones de cantidad. Las enzimas pueden estar adsorbidas sobre sustancias de soporte y/o incorporadas en sustancias de envoltura, para protegerlas contra la inactivación prematura. La concentración de proteína puede ser determinada con ayuda de procedimientos conocidos, por ejemplo el procedimiento BCA ácido bicinónico; 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).
- De modo particularmente preferido, las enzimas muestran efecto sinérgico respecto a su acción contra 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 particularmente preferido está presente un sinergismo así entre la proteasa presente de acuerdo con la invención y otra enzima de un agente, bajo ellas en particular entre la proteasa mencionada y una amilasa y/o una mananasa y/o una lipasa.
- Pueden ocurrir efectos sinérgicos no sólo entre las diferentes enzimas, sino también entre una o varias enzimas y

otros ingredientes del agente.

Entre las proteasas se prefieren aquellas del tipo subtilisina. Son ejemplos de ellas las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, la subtilisina 147 y 309, la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*, subtilisina DY y las enzimas que van a ser asignadas en el sentido estrecho a las subtilasas, aunque ya no a las subtilisinas, 5 termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7. La subtilisina Carlsberg es obtenible en forma refinada bajo el nombre comercial Alcalase® de la compañía Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca.

Las subtilisinas 147 y 309 son distribuidas bajo el nombre comercial Esperase®, o Savinase® de la compañía Novozymes. De la proteasa de *Bacillus lentus* DSM 5483 se derivan las variantes de proteasa conducidas bajo la denominación BLAP®. Otras proteasas convenientes son por ejemplo las enzimas obtenibles bajo el nombre 10 comercial Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym®, Natalase®, Kannase® y Ovozyme® de la compañía Novozymes, las enzimas obtenibles bajo el nombre comercial, Purafect®, Purafect® OxP, Purafect® Prime, Excellase® y Properase® de la compañía Genencor, la enzima obtenible bajo el nombre comercial Protosol® de la compañía Advanced Biochemicals Ltd., Thane, India, la enzima obtenible bajo el nombre comercial Wuxi® de la compañía Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, la enzima obtenible bajo el nombre comercial Proleather® y 15 proteasa P® de la compañía Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japan, y la enzima obtenible bajo la denominación Proteinase K-16 de la compañía Kao Corp., Tokio, Japón. De modo particularmente preferido se usan también las proteasas de *Bacillus gibsonii* y *Bacillus pumilus*, que son divulgadas en los documentos internacionales WO 2008/086916 y WO 2007/131656.

Son ejemplos de amilasas que pueden ser confeccionadas de acuerdo con la invención, las α -amilasas de *Bacillus licheniformis*, de *B. amiloliquefaciens* o de *B. stearothermophilus* así como sus desarrollos avanzados mejorados 20 para el uso en detergentes o agentes de limpieza. La enzima de *B. licheniformis* es obtenible de la compañía Novozymes bajo el nombre Termamyl® y de la compañía Genencor bajo el nombre Purastar®ST. Productos de desarrollo avanzado de esta α -amilasa son obtenibles de la compañía Novozymes bajo el nombre comercial Duramyl® y Termamyl®ultra, de la compañía Genencor bajo el nombre Purastar®OxAm y de la compañía Daiwa Seico Inc., Tokio, Japón, como Keistase®. La β -amilasa de *B. amiloliquefaciens* es distribuida por la compañía Novozymes bajo el nombre BAN®, y variantes derivadas de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* bajo el nombre BSG® y Novamyl®, así mismo de la compañía Novozymes.

Además, para este propósito se resaltan la α -amilasa de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) y la ciclodextrin-glucanotransferasa (CGTasa) de *B. agaradherens* (DSM 9948). Además pueden usarse las enzimas amilolíticas, 30 que están asociadas con el espacio de secuencia de α -amilasas, que se define en el documento internacional WO 03/002711 A2 y que se describe en el documento WO 03/054177 A2. Así mismo, se pueden usar productos de fusión de las moléculas mencionadas.

Además, son adecuados los desarrollos avanzados obtenibles bajo el nombre comercial Fungamyl® de la compañía Novozymes, de la α -amilasa de *Aspergillus niger* y *A. oryzae*. Otros productos comerciales que se 35 pueden usar son por ejemplo la Amilase-LT® y Stainzyme® o Stainzyme ultra® o Stainzyme plus®, estas últimas así mismo de la compañía Novozymes. También pueden usarse de acuerdo con la invención variantes de estas enzimas obtenibles mediante mutaciones puntuales.

Son ejemplos de lipasas o cutinasas que pueden ser confeccionadas de acuerdo con la invención, que están presentes en particular debido a sus actividades de escisión de triglicéridos, pero también para generar in situ 40 perácidos a partir de precursores adecuados, las lipasas obtenibles originalmente de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*) o de desarrollos avanzados, en particular aquellas con el reemplazo de aminoácidos D96L. Son distribuidas por ejemplo por la compañía Novozymes bajo el nombre comercial Lipolase®, Lipolase®Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® y Lipex®.

Además, se pueden usar las cutinasas, que fueron aisladas originalmente de *Fusarium solani* pisi y *Humicola insolens*. Así mismo, son obtenibles lipasas adecuadas de la compañía Amano bajo las denominaciones Lipase CE®, Lipase P®, Lipase B®, o Lipase CES®, Lipase AKG®, Bacillis sp. Lipase®, Lipase AP®, Lipase M-AP® y Lipase AML®. De la compañía Genencor se pueden usar por ejemplo las lipasas o cutinasas, cuya enzima de 45 partida fue aislada originalmente de *Pseudomonas mendocina* y *Fusarium solanii*. Como otros productos comerciales importantes se mencionan las preparaciones M1 Lipase® y Lipomax® distribuidas originalmente por la compañía Gist-Brocades y las enzimas distribuidas por la compañía Meito Sangyo KK, Japón, bajo los nombres Lipase MY-30®, Lipase OF® y Lipase PL®, además el producto Lumafast® de la compañía Genencor.

En el sentido de la invención, los detergentes o agentes de limpieza pueden contener además celulasas, dependiendo del propósito como enzima pura, como preparaciones de enzima o en forma de mezclas, en las 50 cuales los componentes individuales se complementan de manera ventajosa respecto a sus diferentes aspectos de desempeño. Entre estos aspectos de desempeño se cuentan en particular la contribución al poder primario de

lavado, al poder secundario de lavado del agente (efecto contra la nueva deposición o inhibición del agrisamiento) y avivamiento (efecto sobre el tejido), hasta ejercer un efecto de "lavado en piedra".

Una preparación adecuada de celulasa fúngica, rica en endoglucanasa (EG), o bien sus desarrollos avanzados, es ofrecida por la compañía Novozymes bajo el nombre comercial Celluzyme®. Los productos Endolase® y Carezyme® así mismo obtenibles de la compañía Novozymes se basan en la 50 kD-EG, o en 43 kD-EG de *H. insolens* DSM 1800. Otros productos comerciales que se pueden usar de esta compañía son Cellusoft®, Renozyme® y Celluclean®. Además se pueden usar por ejemplo la 20 kD-EG de *Melanocarpus*, que es obtenible de la compañía AB Enzymes, Finlandia, bajo el nombre comercial Ecostone® y Biotouch®. Otros productos comerciales de la compañía AB Enzymes son Econase® y Ecopulp®. Otras celulasas adecuadas son de *Bacillus* sp. CBS 670.93 y CBS 669.93, en las cuales la de *Bacillus* sp. CBS 670.93 es obtenible de la compañía Genencor bajo el nombre comercial Puradax®. Otros productos comerciales de la compañía Genencor son "Genencor detergent celulasa L" e IndiAge®Neutra.

Además, pueden usarse otras enzimas en particular para la eliminación de determinadas suciedades que son problema, las cuales se compilan bajo el concepto de hemicelulasas. A ellas pertenecen por ejemplo mananasas, xantanoliasas, pectinliasas (=pectinasas), pectinesterasas, pectatliasas, xiloglucanasas (=xilanasas), pululananas y β-glucanasas. Respecto a esto, las enzimas adecuadas son obtenibles por ejemplo bajo los nombres Gamanase® y Pektinex AR® de la compañía Novozymes, bajo el nombre Rohapec® B1L de la compañía AB Enzymes y bajo el nombre Pyrolasa® de la compañía Diversa Corp., San Diego, CA, EEUU. La β-glucanasa de *Bacillus subtilis* es obtenible bajo el nombre Cereflo® de la compañía Novozymes. Las hemicelulasas particularmente preferidas de acuerdo con la invención son las mananasas, que son distribuidas por ejemplo bajo el nombre comercial Mannaway(R) del fabricante Novozymes o Purabrite® del fabricante Genencor.

Para el aumento del efecto de blanqueo, los agentes en el sentido de la invención pueden contener también oxidorreductasas, por ejemplo oxidasas, oxigenasas, catalasas (que a bajas concentraciones de H₂O₂ reaccionan como peroxidasas), peroxidasas, como halo-, cloro-, bromo-, lignin-, glucosa- o manganoperoxidasas, dioxigenasas o lacasas (fenoloxidasas, polifenoloxidasas). Como productos comerciales adecuados se mencionan Denilite® 1 y 2 de la compañía Novozymes. Como sistemas a modo de ejemplo que se pueden usar de manera ventajosa para una perhidrólisis enzimática se remite a los documentos WO 98/45398 A1, WO 2005/056782 A2 así como WO 2004/058961 A1. El documento WO 2005/124012 describe un sistema de blanqueo enzimático combinado, que comprende una oxidasa y una perhidrolasa. De manera ventajosa se añaden adicionalmente compuestos que interactúan con las enzimas, preferiblemente orgánicos, de modo particularmente preferido aromáticos, para reforzar (potenciador) la actividad de las oxidorreductasas en cuestión, o para garantizar el flujo de electrones (mediadores) a potenciales redox fuertemente diferentes, entre las enzimas oxidantes y las suciedades.

Las enzimas usadas de acuerdo con la invención provienen bien sea originalmente de microorganismos por ejemplo de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, o *Pseudomonas*, y/o son producidas de acuerdo con procedimientos biotecnológicos de por sí conocidos por microorganismos adecuados, por ejemplo mediante huéspedes transgénicos de expresión del género *Bacillus* o por hongos filamentosos. La purificación de la enzima en cuestión ocurre de manera conveniente mediante un procedimiento establecido, por ejemplo mediante precipitación, sedimentación, concentración, filtración de la fase líquida, microfiltración, ultrafiltración, acción de sustancias químicas, desodorización o combinaciones adecuadas de estas etapas. Además, las enzimas pueden ser confeccionadas junto con sustancias acompañantes, por ejemplo de la fermentación, o con estabilizantes.

El uso de un detergente o agente de limpieza de acuerdo con la invención para la eliminación de suciedades, en particular de suciedades sensibles a la proteasa, sobre textiles o superficies duras, es decir para la limpieza de textiles o de superficies duras, representa un objetivo propio de la invención. Entonces, los agentes pueden, en particular debido a la combinación de proteasa y fosfonato presentes, ser usados de manera ventajosa para separar de textiles o de superficies duras las correspondientes impurezas. Por ejemplo el lavado de manos, la eliminación manual de manchas de textiles o de superficies duras o el uso en combinación con un procedimiento automático, representan formas de realización de este objetivo de la invención.

Todos los asuntos, objetivos y formas de realización que se describen para detergentes o agentes de limpieza, son aplicables también en este objetivo de la invención. Por ello en este pasaje se remite de manera expresa a la divulgación de pasajes correspondientes, con la observación según la cual esta divulgación también es válida para el precedente uso de acuerdo con la invención.

Un procedimiento para la limpieza de textiles o de superficies duras representa otro objetivo de acuerdo con la invención, en el cual por lo menos en una de las etapas del procedimiento se usa un detergente o agente de limpieza. En consecuencia, el procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras se caracteriza porque en por lo menos una etapa del procedimiento, se usa un detergente o agente de limpieza.

Dentro de ellos caen tanto procedimientos manuales como también automáticos, en los que se prefieren los procedimientos automáticos debido a la posibilidad de controlarlos de manera precisa, lo cual concierne por ejemplo a las cantidades usadas y tiempos de acción.

5 Los procedimientos para la limpieza de textiles se distinguen en general porque en varias etapas del procedimiento, diferentes sustancias con actividad de limpieza son aplicadas sobre el material que se va a limpiar y después del tiempo de acción se enjuagan, o porque el material que se va a lavar es tratado de otra forma con un detergente o una solución o dilución de este agente. De modo correspondiente, es válido para 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 enriquecidos en al menos una de las etapas del procedimiento para el uso de un detergente o agente de limpieza y representan entonces formas de realización de la presente invención.

10 Todos los asuntos, objetivos y formas de realización que se describen para detergentes o agentes de limpieza, son aplicables también en este objetivo de la invención. Por ello en este pasaje se remite de manera expresa a la divulgación de pasajes correspondientes, con la observación según la cual esta divulgación también es válida para el precedente procedimiento de acuerdo con la invención.

15 En una forma preferida de realización, el procedimiento se caracteriza porque el fosfonato está presente en el licor de lavado en una concentración de 0,00075 a 0,05 % en peso y/o porque la proteasa está presente en el licor de lavado en una concentración de 0,0005 a 0,03 % en peso. Otras concentraciones preferidas del fosfonato presente en el licor de lavado son de 0,00075 a 0,01125 % en peso, de 0,001 a 0,035 % en peso, de 0,002 a 0,01125 % en peso o de 0,00375 a 0,0075 % en peso. Otras concentraciones preferidas de proteasa presente en el licor de lavado son de 0,00075 a 0,03 % en peso o de 0,00077 a 0,028 % en peso.

20 En otra forma preferida de realización, el procedimiento se caracteriza porque es ejecutado a una temperatura entre 10 °C y 60 °C, entre 10 °C y 55 °C, entre 10 °C y 50 °C, entre 10 °C y 40 °C o entre 20 °C y 40 °C.

25 Las proteasas usadas en los agentes son de modo correspondiente con las realizaciones precedentes, que se pueden usar de manera ventajosa en detergentes y agentes de limpieza en el sentido de la invención, así como en procedimientos de acuerdo con la invención, en particular en procedimientos de lavado y limpieza. Por consiguiente pueden ser usadas de manera ventajosa para suministrar a los correspondientes agentes una actividad proteolítica.

30 Por ello, forma otro objetivo de la invención 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 los aminoácidos ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D), para el suministro de una actividad proteolítica a un detergente o agente de limpieza líquido, el cual incluye un fosfonato en una cantidad de 0,01 a 4 % en peso.

35 La divulgación comprende también el uso de una proteasa (a2) que comprende una secuencia de aminoácidos la cual 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 los aminoácidos 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 los aminoácidos alanina (A) o glicina (G) o serina (S), para suministrar una actividad proteolítica a un detergente o agente de limpieza líquido, el cual comprende además un fosfonato.

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

- (a) treonina en la posición 3 (3T),
- (b) isoleucina en la posición 4 (4I),
- 45 (c) alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61R),
- (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 (211D, 211E o 211G),

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

Forma otro objetivo de la invención 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 o SEQ ID NO. 3;

5 b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3, en la que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegido 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 61R),

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 (211D, 211E o 211G),

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

para el suministro de una actividad proteolítica en un detergente o agente de limpieza líquido, el cual comprende además un fosfonato en una cantidad de 0,01 a 4 % en peso.

Forma otro objetivo de la divulgación el uso de una proteasa, que es elegida de entre el grupo consistente en

20 a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con 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 en por lo menos una posición respecto a 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 las que la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegido de entre el grupo consistente en:

25 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 61R),

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

v. prolina en la posición 188 (188P),

30 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 (211D, 211E o 211G),

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

35 para suministrar una actividad proteolítica a detergente o agente de limpieza líquido, el cual comprende además un fosfonato.

Todos los asuntos, objetivos y formas de realización que se describen para detergentes o agentes de limpieza, son aplicables también en los usos mencionados. Por ello en este pasaje se remite de manera expresa a la divulgación de pasajes correspondientes, con la observación según la cual esta divulgación también es válida para los usos precedentes de acuerdo con la invención.

Ejemplos

5 Todos los documentos de trabajo de biología molecular siguen procedimientos estándar, como indica por ejemplo en el manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, o trabajos pertinentes comparables. Se usaron enzimas y conjuntos de construcción (kits) de acuerdo con los datos del respectivo fabricante.

Ejemplo 1

Determinación del poder de limpieza de un detergente líquido

10 Para este ejemplo se usaron textiles con suciedad estandarizada, que habían sido obtenidos de la compañía EMPA Testmaterialien AG (St. Gallen, Suiza), de wfk Testgewebe GmbH (Bruggen-Bracht, Alemania) o del Center for Testmaterials (CFT, Vlaardingen, Países Bajos). Al respecto se usaron las siguientes suciedades y textiles:

A: Pasto sobre algodón: producto número 164 de la compañía Eidgenössische Material- y Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza;

B: Aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón: producto número PC-10 de CFT (Center for Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos;

15 C: Huevo entero/pigmento (huevo entero/hollín) sobre algodón: producto número 10N de la compañía wfk Testgewebe GmbH; Bruggen-Bracht, Alemania;

D: Sangre-leche/tinta china sobre algodón: producto número C-05 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V. Vlaardingen, países bajos

20 Con estos materiales de prueba, se investigaron diferentes detergentes respecto a su poder de limpieza. Para ello se lavaron las cargas por 60 minutos a temperaturas de 40 °C o 20 °C. La dosificación estuvo en 7,4 gramos de detergente por litro de licor de lavado. Se lavó con un agua de la ciudad con una dureza de aproximadamente 16° de dureza alemana. Como detergente sirvió una receta base de detergente, como se indicó previamente en la tabla 1.

25 A esta receta base de detergente se añadieron para las diferentes series de ensayo, con la misma actividad (concentración final de 5 PE/ml) las siguientes proteasas: proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2 (Carga 1), variante F49 de potencia mejorada de la proteasa de Bacillus lentus de acuerdo con WO 95/23221 (Carga 2) y la proteasa divulgada en la figura 2 o SEQ ID NO. 3 del documento internacional WO 03/057713 (Carga 3).

30 Después del lavado se midió el grado de blancura de los textiles lavados. La medición ocurrió en un espectrómetro Minolta CM508d (Lichtart D65, 10°). El aparato fue calibrado primero con un estándar blanco incluido. Los resultados obtenidos son las diferencias en emisión entre un procedimiento de lavado con un detergente que contiene una proteasa y un ciclo de lavado de control ejecutado en paralelo con un detergente sin proteasa. En la siguiente tabla 2 se compilan los resultados y permiten una inmediata conclusión sobre el aporte de la enzima presente en cada caso, el poder de limpieza del agente usado.

35 Tabla 2: Resultados del lavado con un agente líquido a 40 °C o 20 °C

Suciedad	Carga 1		Carga 2		Carga 3	
	40 °C	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	20 °C
A	1,4	1,3	1,4	0,4	1,0	0,7
B	5,2	4,9	4,0	2,9	4,9	4,2
C	3,0	3,5	4,9	2,3	2,1	2,4
D	16,7	12,6	13,6	11,4	15,4	11,1

Es claro que un detergente en el sentido de la invención muestra un poder de lavado muy bueno y en la mayoría de las suciedades incluso mejorado, en comparación con los detergentes de las cargas 2 y 3.

Ejemplo 2

Determinación del poder de limpieza de un detergente líquido para lavado automático de vajillas

Se estandarizaron recipientes con superficies duras, lisas, dotados de las respectivas suciedades y se lavaron con una lavadora doméstica corriente del mercado para vajillas, a 40 °C así como 50 °C. Por ciclo de lavado se usaron en cada caso 30 ml de un detergente para vajillas líquido o en forma de gel o líquido, corriente en el mercado para lavado automático, que contenía 2,4 % en peso de fosfonato (HEDP). Se lavó con agua de la ciudad con una dureza de aproximadamente 21° de dureza alemana. Como proteasa se usó Savinase ultra 16L (Novozymes, Carga 1) y una proteasa de acuerdo con la invención que comprendía una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2 (Carga 2). Las proteasas fueron usadas con control respecto a la proteína de enzima (0,68g de Savinase ultra 16L o bien la cantidad controlada de proteína de enzima proteasa de acuerdo con la invención por 30ml de agente de limpieza).

Después del enjuague, se determinó el retiro de las suciedades bien sea por vía gravimétrica (yema de huevo) o visual (otras suciedades de acuerdo con la tabla 3). Para la determinación gravimétrica se determinó la diferencia del peso del recipiente sucio y lavado (liberado de yema de huevo) y se refirió este a la cantidad de yema de huevo aplicada originalmente, de acuerdo con la siguiente fórmula: % de poder de limpieza = (mg de yema de huevo retirada/ mg de yema de huevo aplicada) x 100. Para la determinación visual del retiro de suciedad, personas entrenadas al respecto asignaron visualmente una escala porcentual. En la siguiente tabla 3 se compilan los resultados y permiten una conclusión inmediata sobre el aporte de la enzima presente en cada caso, al poder de limpieza del agente usado.

Tabla 3: poder de limpieza de un detergente líquido de acuerdo con la invención para lavado automático de vajillas a 40 °C o 50 °C

Suciedad	40 °C		50 °C	
	Carga 1	Carga 2	Carga 1	Carga 2
Leche	74	76	74	74
Carne desmenuzada	99	100	94	98
Yema de huevo	37	47	47	65

Es claro que un detergente líquido para lavado automático de vajillas en el sentido de la invención muestra un poder de limpieza muy bueno, incluso uno claramente mejorado, y en particular sobre la suciedad de yema de huevo, en comparación con el detergente para vajillas de acuerdo con la Carga 1.

Ejemplo 3

Determinación de la estabilidad al almacenamiento de un detergente líquido

Se revisó la estabilidad al almacenamiento del detergente de acuerdo con la Carga 1 y 2 del Ejemplo 1. Para ello se almacenaron los detergentes a una temperatura de 30 °C por el intervalo de tiempo indicado en cada caso y se determinó la respectiva actividad proteolítica residual a través de la liberación desde el sustrato del cromóforo para-nitroanilina (pNA). El sustrato es suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). La proteasa escindió el sustrato y liberó pNA. La liberación del pNA causó un aumento de la extinción a 410 nm, cuyo curso en el tiempo es una medida de la actividad enzimática (véase del Mar et al., 1979). La medición ocurrió a una temperatura de 25 °C, a pH 8,6 y una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición fue 5 min. para un intervalo de medición de 20s a 60s. En la siguiente Tabla 4 se indican las actividades residuales obtenidas.

Tabla 4: determinación de la actividad proteolítica residual después del almacenamiento

Detergente de acuerdo con	Inicio	Semana 1	Semana 2
Carga 1	100 %	71 %	77 %
Carga 2	100 %	47 %	37 %

Es claro que un detergente en el sentido de la invención exhibe una estabilidad al almacenamiento claramente mejorada, en comparación con un detergente de acuerdo con la Carga 2. Después de una semana, el detergente en el sentido de la invención exhibe un aumento en la actividad proteolítica de 151 % o después de dos semanas

de 211 %.

Listado de secuencias

<110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Detergente o agente de limpieza líquido estable al almacenamiento que contiene proteasas

5 <130> H 08707 PCT

<150> DE 102009029513

<151> 2009-09-16

<160> 8

<170> PatentIna version 3.3

10 <210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

<400> 1

ES 2 661 317 T3

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

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

ES 2 661 317 T3

<211> 269

<212> PRT

<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

5 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 2 661 317 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> 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

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

ES 2 661 317 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> 4

<211> 269

<212> PRT

5 <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

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 2 661 317 T3

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

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Bacillus lentus

<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

ES 2 661 317 T3

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

<210> 6

<211> 269

<212> PRT

ES 2 661 317 T3

<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

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

ES 2 661 317 T3

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

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 2 661 317 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> 8

<211> 269

5 <212> PRT

<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

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

ES 2 661 317 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

REIVINDICACIONES

1. Uso de una proteasa,

5 (a1) que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en por lo menos el 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 los aminoácidos ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D), para el suministro de una actividad proteolítica en un detergente o un agente de limpieza líquidos, el cual comprende además un fosfonato en una cantidad del 0,01 al 4 % en peso.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la proteasa en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe además por lo menos uno de los siguientes aminoácidos:

- 10 (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 61R),
 (d) ácido asparagínico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
 (e) prolina en la posición 188 (188P),
 15 (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 (211D, 211E o 211G),
 (i) combinaciones de (a) a (h).

3. Uso de una proteasa, que es elegida de entre el grupo que consiste en

- 20 a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3;
 b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3, en donde la modificación en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:
- 25 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 61R),
 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),
 30 vii. isoleucina en la posición 199 (199I),
 viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211D, 211E o 211G),
 ix. combinaciones de (i) a (viii);

para proporcionar una actividad proteolítica en un detergente o un agente de limpieza líquidos, que comprenden además un fosfonato en una cantidad del 0,01 al 4 % en peso.

35 4. Uso de un detergente o un agente de limpieza que comprenden una proteasa y un fosfonato, como se describe en una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el fosfonato es elegido de entre el grupo consistente en ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido aminotri(metilenfosfónico) (ATMP), ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico) (DTPMP o DETPMP o DTPNT), ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP), ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBS-AM) así como combinaciones de ellos.

40 5. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la proteasa está contenida en una cantidad del 1×10^{-8} al 5 por ciento en peso, referido a la proteína activa.

6. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** comprende además un componente que es elegido de entre
- i. sustancia aniónica y/o polianiónica y/o
 - ii. sustancia catiónica y/o policatiónica y/o
 - 5 iii. sustancia que exhibe grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo.
7. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** comprende por lo menos otro ingrediente, en particular uno que es elegido de entre el grupo consistente en tensioactivo, sustancia estructural (agente de relleno), compuesto de peroxígeno, activador de blanqueo, alcohol, ácido, inhibidor de agrisamiento, aclarador óptico, inhibidor de espuma, sal soluble en agua, espesante, álcali y/o base volátiles, agente que imparte
- 10 carácter hidrofílico así como combinaciones de ellos.
8. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** comprende por lo menos otra enzima, en particular proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, β -glucosidasa, carraginasas, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa, así como preferiblemente sus mezclas.
- 15 9. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para la eliminación de suciedades sensibles a la proteasa sobre textiles o superficies duras.
10. Procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras **caracterizado porque** en por lo menos una etapa del procedimiento se usa un detergente o un agente de limpieza como se define en una de las reivindicaciones 1 a 8.
- 20 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** el fosfonato está presente en el licor de lavado en una concentración del 0,00075 al 0,05 % en peso, y/o porque la proteasa está presente en el licor de lavado en una concentración del 0,0005 al 0,03 % en peso.
12. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado porque** es realizado a una temperatura entre 10 °C y 60 °C.