(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 765 524**

(51) Int. CI.:

C12N 9/54 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2011 E 16170897 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3095860**

(54) Título: **Agente de lavado o detergente líquido estables al almacenamiento, que contienen proteasa y amilasa**

(30) Prioridad:

17.12.2010 DE 102010063458

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Agente de lavado o detergente líquido estables al almacenamiento, que contienen proteasa y amilasa

La invención está en el ámbito de los detergentes y agentes de lavado líquidos. La invención se refiere en particular a detergentes y agentes de lavado líquidos que tienen enzimas, que contienen proteasas definidas en combinación con una amilasa, y propone además métodos en los cuales se usen tales agentes. La invención se refiere además a aplicaciones de proteasas definidas en agentes de lavado o detergentes líquidos, que contienen una amilasa.

Para detergentes y agentes de lavado se usan preferiblemente proteasas del tipo de subtilisina. Las proteasas usadas en los detergentes o agentes de lavado conocidos del estado de la técnica provienen bien sea originalmente de microorganismos, por ejemplo de las especies Bacillus, Streptomyces, Humicola, o Pseudomonas, y/o son producidas según métodos de biotecnología de por sí conocidos, mediante microorganismos adecuados, por ejemplo mediante huésped de expresión transgénica de las especies Bacillus o por hongos filamentosos.

En particular en agentes de lavado líquidos modernos están presentes de manera creciente otras enzimas, entre otras en particular amilasas. Una amilasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces glicósido, en particular en polisacáridos como almidón. Entre las amilasas se usan en agentes de lavado y detergentes frecuentemente α-amilasas, las cuales hidrolizan el enlace a(1-4)-glicósido de la amilosa. Dentro de la clasificación EC de las enzimas, el sistema numérico de clasificación para enzimas, las α -amilasas exhiben el número EC (en inglés "Enzyme Commission number") 3.2.1.1 y en consecuencia están en la tercera de las seis categorías principales de enzimas, las hidrolasas (E.C.3.-.-.-), bajo esto en las gicosilasas (E.C. 3.2.-.-) y nuevamente bajo esto en las glicosidasas (E.C. 3.2.1.-), es decir enzimas que hidrolizan enlaces O y/o S-glicosilo. En la degradación de almidón por α-amilasas surgen dextrinas y de ellas maltosa, glucosa y oligosacáridos ramificados. Las amilasas actúan en consecuencia en particular contra los residuos que contienen almidón en la ropa para lavar y catalizan su hidrólisis.

En el documento internacional WO 95/23221 se divulgan proteasas o bien variantes de proteasa del tipo subtilisina de Bacillus lentus DSM 5483, que son adecuadas para el uso en agentes de lavado o detergentes. Entre estas proteasas está también una, que puede exhibir un intercambio de aminoácidos R99E, A, S o G. Además se manifiesta de los agentes de lavado puede contener otra enzima, también una amilasa. Los agentes de lavado pueden ser sólidos o líquidos. Sin embargo no surge de este escrito de manera inmediata y clara un agente de lavado líquido, que contiene una amilasa en combinación con una proteasa, que en la posición 99 exhibe el aminoácido ácido glutámico (E) o ácido asparagínico (D) o el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q) o el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S). De modo correspondiente es válido para el documento europeo EP 1921147.

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

La presente invención basa su objetivo en superar la desventaja mencionada, y poner a disposición agentes de lavado o detergentes líquidos que contienen proteasa y amilasa, que son suficientemente estables al almacenamiento o tiene estabilidad al almacenamiento mejorada, en particular respecto a su actividad amilolítica.

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

(a1) una proteasa, la cual incluye una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido ácido asparagínico (D) y
(b) una amilasa.

En el presente documento se divulga además un agente de lavado o un detergente líquido que comprende

(a1) una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido ácido glutámico (E), o
(a2) una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q), o
(a3) una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración según SEQ ID

NO. 1 exhibe el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S), y
(b) una amilasa.

De modo sorprendente se determinó que un agente de lavado o detergente líquido, el cual contiene la combinación de una proteasa tal con una amilasa, es de manera ventajosa estable al almacenamiento. En particular exhibe una elevada actividad amilolítica después del almacenamiento, en comparación con un agente de lavado o detergente, que se diferencia de un agente de acuerdo con la invención solamente en la proteasa presente en el respectivo agente, en el que en el agente que va a ser comparado la proteasa está presente en igual concentración al comienzo del almacenamiento, referido a la enzima activa. Una proteasa prevista en el marco de la presente invención conduce por ello a una reducción en la inactivación de la amilasa. Sin embargo, la reducción en la inactivación de amilasa por la proteasa prevista en el marco de la presente invención no se basa en una insuficiente actividad de proteasa.

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

Respecto al documento internacional WO 95/23221 introductorio mencionado, la presente invención es con ello una elección particularmente ventajosa, que conduce a la obtención de un agente de lavado líquido estable al almacenamiento y poderoso, en particular respecto a la actividad proteolítica y/o amilolítica del agente o bien actividad residual del agente después de almacenamiento.

En el marco de la presente invención se entiende por poder de limpieza el poder de blanqueo sobre uno o varios ensuciamientos, en particular ensuciamiento de ropa. Son ejemplos de tales ensuciamientos sangre-leche/tinta sobre algodón, huevo completo/pigmento sobre algodón, chocolate-leche/tinta sobre algodón, aceite de maní-pigmento/tinta sobre poliéster/algodón, pasto sobre algodón o cacao sobre algodón, en particular tales como se indican adicionalmente abajo. En el marco de la invención exhiben tanto el agente de lavado o detergente, que incluye la proteasa y la amilasa o bien el licor de lavado o limpieza formado con este agente, como también la proteasa o bien la amilasa en sí mismas, un respectivo poder de limpieza. El poder de limpieza de la enzima contribuye con ello al poder de limpieza del agente o bien del licor de lavado o bien de limpieza formado mediante el agente. El poder de limpieza es determinado preferiblemente como se indica adicionalmente abajo.

Se entiende por licor de lavado o bien de limpieza a la solución de uso que contiene el agente de lavado o detergente, que actúa sobre textiles o tejidos (licor de lavado) o bien superficies duras (licor de limpieza) y con ello entra en contacto con los ensuciamientos presentes en textiles o bien tejidos o superficies duras. Comúnmente, el licor de lavado o bien de limpieza surge cuando comienza el procedimiento de lavado o de limpieza y el agente de lavado o detergente, por ejemplo en una máquina lavadora o en otro recipiente adecuado, es diluido con agua.

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

Respecto a esto, la actividad enzimática puede ocurrir - ajustada al respectivo tipo de enzima - de modo y forma corriente de acuerdo con el estado la técnica. Los métodos para la determinación de la actividad son familiares para los expertos en el campo de la tecnología de las enzimas y son aplicados por ellos de manera rutinaria. Por ejemplo en Surfactantes, volumen 7 (1970), pp. 125-132 se divulgan métodos para la determinación de la actividad de proteasa. Además, la actividad proteolítica puede ser determinada mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) desde el sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). La proteasa escinde el sustrato y libera pNA. La liberación del pNA causa un aumento en la extinción a 410 nm, cuyo transcurso en el tiempo es una medida de la actividad enzimática (véase del Mar et al., 1979). Esta medición ocurre a una temperatura de 25 °C, a pH de 8,6 y una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición es de 5

minutos para un intervalo de medición de 20 s a 60 s. Preferiblemente, la actividad de proteasa es indicada en PE (unidades de proteasa).

La actividad de amilasa es determinada de manera corriente de acuerdo al estado la técnica. Preferiblemente, se determina la actividad de amilasa como se indicó anteriormente. Las amilasas transforman almidón en glucosa. Bajo condiciones definidas de reacción (amortiguador de trismaleato de pH 6,5, 50 °C, 15 minutos) se incuban las muestras que van a ser investigadas, con 0,67 % de almidón (soluble, tratado previamente según Zulkowsky (tratado con glicerina a 190 °C)). Mediante adición de ácido dinitrosalicílico y calentamiento a 100 °C se reduce éste mediante glucosa y otros azúcares reductores bajo condiciones alcalinas hasta un colorante rojo naranja, el cual es determinado después del final de la reacción de manera fotométrica a 540 nm. Al respecto, la cantidad del azúcar liberado correspondiente al color es una medida de la actividad enzimática (véase Sumner et al., J. Biol. Chem., 1921, 47 & 1924, 62).

Preferido de modo particular, en el sentido de la presente invención se determina la presencia de una estabilización de enzima, como se indicó anteriormente, mediante el uso de un agente de lavado o detergente líquido que contiene proteasa y amilasa, el cual se almacena por ocho semanas a una temperatura de 30 °C, en el que se determina la actividad proteolítica mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) desde el sustrato suc-AAPF-pNA, y se determina la actividad amilolítica como se indicó anteriormente.

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

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

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

Una amilasa es una enzima como se describió en la introducción. Para amilasas pueden usarse conceptos sinónimos, por ejemplo 1,4-alfa-D-glucan-glucanohidrolasa o glicogenasa. Preferiblemente las α-amilasas son amilasas que pueden ser preparadas de acuerdo con la invención. Es decisivo para ello, si una enzima es una α-amilasa en el sentido de la invención, es su capacidad de hidrolizar enlaces α(1-4)-glicósido en la amilosa del almidón.

Las amilasas preparadas de acuerdo con la invención son por ejemplo las α-amilasas de Bacillus licheniformis, de Bacillus amiloliquefaciens o de Bacillus stearotermophilus así como en particular también sus desarrollos adicionales mejorados para el uso en agentes de lavado o detergentes. La enzima de Bacillus licheniformis es obtenible de la compañía Novozymes bajo los nombres Termamil® y de la compañía Danisco/Genencor bajo los nombres Purastar®ST. Son obtenibles productos de desarrollo adicional de esta α-amilasa, de la compañía Novozymes bajo los nombres comerciales Duramil® y Termamil®ultra, de la compañía Danisco/Genencor bajo los nombres Purastar®OxAm y de la compañía Daiwa Seiko Inc., Tokio, Japón, como Keistasa®. La α-amilasa de Bacillus amiloliquefaciens es vendida por la compañía Novozymes bajo los nombres BAN®, y variantes derivadas de la α-amilasa de Bacillus stearotermophilus bajo los nombres BSG® y Novamil®, así mismo de la compañía Novozymes. Además, se destaca para este propósito la α-amilasa de Bacillus sp. A 7-7 (DSM 12368) y la ciclodextrin-glucanotransferasa (CGTasa) de Bacillus agaradherens (DSM 9948). Así mismo pueden ser utilizados productos de fusión de todas las moléculas mencionadas. Además, son adecuados los desarrollos adicionales de la α-amilasa de Aspergillus niger y A. oryzae, obtenibles bajo los nombres comerciales Fungamil® de la compañía Novozymes. Otros productos comerciales que pueden ser utilizados de manera ventajosa son por ejemplo la Amilasa-LT® y Stainzyme® o Stainzyme ultra® o bien Stainzyme plus®, estos últimos así mismo de la compañía

Novozymes. También pueden usarse de acuerdo con la invención variantes de esta enzima obtenibles mediante mutaciones puntuales. En los documentos internacionales WO 00/60060, WO 03/002711, WO 03/054177 y WO07/079938 se manifiestan amilasas preferidas de modo particular, a cuya divulgación se remite de modo expreso o bien cuyo contenido de divulgación se incluye respecto a esto expresamente en el presente documento.

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

(a) treonina en la posición 3 (3T),
(b) isoleucina en la posición 4 (4I),
(c) alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 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).

Aparte de los aminoácidos mencionados, la proteasa exhibe por ello en la posición 99 uno o varios de los aminoácidos previamente mencionados, en las respectivas posiciones. Estos aminoácidos pueden causar otras propiedades ventajosas y/o fortalecer aún propiedades ya presentes. En particular, los aminoácidos mencionados anteriormente provocan una elevación de la actividad proteolítica y/o la estabilidad de la proteasa en un agente de lavado o detergente líquidos o bien en el líquido de lavado formado por este agente de lavado o detergente. Mediante la adición de una proteasa así a un agente de lavado o detergente líquido, el cual contiene una amilasa, se obtiene con ello así mismo un agente de lavado líquido particularmente estable al almacenamiento, en particular respecto a su actividad amilolítica remanente después del almacenamiento, pero particularmente también respecto a su actividad proteolítica remanente después del almacenamiento, en particular después de una duración de almacenamiento preferiblemente de modo creciente de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o 8 semanas. Además, un agente tal muestra poderes mejorados de limpieza sobre ensuciamientos sensibles a proteasa y/o amilasa.

Las secuencias de aminoácidos son definidas con ello 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 en el estado de la técnica la proteasa de Bacillus lentus representa una importante molécula de referencia para la descripción de proteasas y de cambios de aminoácidos, es ventajoso en la asignación de posiciones de aminoácidos referirse a la numeración de la proteasa de Bacillus lentus (SEQ ID NO. 1). Además se sigue la numeración de la proteína madura (madura). Esta asignación se usa también cuando la secuencia de aminoácidos de la proteasa que se va a usar incluye un número mayor de radicales aminoácidos comparados con la proteasa de Bacillus lentus según SEQ ID NO. 1. Partiendo de las posiciones mencionadas en la secuencia de aminoácidos de la proteasa de Bacillus lentus, las posiciones de aminoácidos en una proteasa que se va a usar de acuerdo con la invención son aquellas que en una alineación coinciden incluso con estas posiciones.

Además de la posición 99, por lo tanto, son ventajosas en particular las posiciones 3, 4, 61, 154, 188, 193, 199 y 211 para ser asignadas a una alineación con SEQ ID NO. 1 y con ello en la numeración según SEQ ID NO. 1. En las posiciones mencionadas en la molécula tipo silvestre de la proteasa de Bacillus lentus están los siguientes radicales aminoácidos: S3, V4, G61, S154, A188, V193, V199, y L211. Se prefieren de modo particular los aminoácidos 3T, 4I, 61A, 154D, 154E, 211D, 211G y 211E, en tanto las correspondientes posiciones en una proteasa que va a ser usada de acuerdo con la invención no estén ocupadas ya con uno de estos aminoácidos preferidos. Los intercambios 3T y 4I conducen por ejemplo mediante un efecto de estabilización sobre la molécula, a un mejoramiento de la estabilidad al almacenamiento y del poder de limpieza de la proteasa y con ello a un poder mejorado de limpieza de un agente de lavado o detergente líquido de acuerdo con la invención, que contiene la proteasa.

Si se colocan uno o varios de los aminoácidos previamente mencionados en la respectiva posición, surgen adicionalmente a la posición 99 otras desviaciones de secuencia de SEQ ID NO. 1, puesto que SEQ ID NO. 1 exhibe otro aminoácido en la respectiva posición. Dependiendo de la cantidad de desviaciones de secuencia de SEQ ID NO.1 presentes, surgen por ello diferentes valores de identidad máxima que puede exhibir una proteasa que va a ser usada de acuerdo con la invención, frente a SEQ ID NO. 1, en sí misma cuando ella debería coincidir en todos los otros aminoácidos con SEQ ID NO. 1. Es de considerar esta circunstancia para cada combinación posible de los aminoácidos sugeridos en el caso individual y depende también además de la longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteasa. Por ejemplo, la identidad máxima para uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve cambios de secuencia es de 99,63 %, 99,26 %, 98,88 %, 98,51 %, 98,14 %, 97,77 %, 97,40 %, 97,03 % o bien 96,65 % para una secuencia de aminoácidos con longitud de 269 aminoácidos, o bien

99,64 %, 99,27 %, 98,91 %, 98,55 %, 98,18 %, 97,82 %, 97,45 %, 97,09 % o bien 96,73 % para una secuencia de aminoácidos con una longitud de 275 aminoácidos.

La determinación de la identidad de secuencia de ácido nucleico o aminoácidos ocurre por una comparación de secuencias. Tal comparación ocurre mediante asignación mutua de secuencias similares en las secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. Esta comparación de secuencia ocurre preferiblemente con base en el algoritmo BLAST establecido en el estado de la técnica y usado comúnmente (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, and David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389-3402) y ocurre principalmente mediante la asignación mutua de sucesiones similares de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de ácidos nucleicos o bien 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 secuencias (alineaciones), en particular comparaciones múltiples de secuencias, son construidas comúnmente con programas de computador. Son frecuentemente usadas 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), TCoffee (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 bien algoritmos. En el marco de la presente invención se construyen comparaciones de secuencia y alineaciones preferiblemente con el programa de computador Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, USA) con los parámetros estándar preestablecidos (Default).

Tal comparación permite una declaración sobre la similitud de las secuencias comparadas una con otra. Ellas son indicadas comúnmente en identidad porcentual, es decir la fracción de nucleótidos o radicales aminoácidos idénticos en la misma o bien en una alineación de posiciones mutuamente correspondientes. Los otros conceptos contenidos en la homología tienen correlación con intercambio de aminoácidos que conserva secuencia de aminoácidos en la consideración con uno, por consiguiente aminoácidos con propiedades similares, puesto que estos dentro de la proteína ejercen mayormente actividades o bien funciones similares. Por ello la similitud de las secuencias comparadas puede ser indicada también como homología porcentual o similitud porcentual. Los datos de identidad y/u homología pueden ser encontrados para polipéptidos o genes totales o solo para ámbitos individuales. Los ámbitos homólogos o bien idénticos de diferentes secuencias de ácidos nucleicos o bien de aminoácidos son definidos por ello mediante coincidencias en las secuencias. Ellos exhiben frecuentemente funciones iguales o similares. Ellos pueden ser pequeños e incluir solo pocos nucleótidos o bien aminoácidos. Frecuentemente tales ámbitos pequeños ejercen funciones esenciales para la actividad total de la proteína. Por ello, puede tener sentido correlacionar coincidencias de secuencias solo sobre ámbitos pequeños, dado el caso individuales. En tanto no se indique de otro modo, en el presente documento los datos de identidad o bien homología se refieren a la longitud total de la secuencia de ácidos nucleicos o bien aminoácidos indicada en cada caso.

En otra forma de realización de este objetivo de la invención, el agente de lavado o detergente se caracteriza porque la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos, la cual para la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 como se indicó anteriormente es idéntica y la cual es obtenida o bien es obtenible a partir de una proteasa según SEQ ID NO. 1 mediante sustitución conservadora única o múltiple de aminoácidos, en la que la proteasa en la posición 99 todavía exhibe un aminoácido previsto para esa posición, como se describió anteriormente. El concepto "sustitución conservadora de aminoácidos" significa intercambio (sustitución) de un radical aminoácido por a otro radical aminoácido, en el que este intercambio no conduce a cambio de la polaridad o carga en la posición del aminoácido intercambiado, por ejemplo intercambio de un radical aminoácido apolar. En el marco de la invención, las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen 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, se caracteriza un agente de lavado o detergente de acuerdo con la invención además porque su poder de limpieza corresponde por lo menos al de un agente de lavado o bien detergente que contiene una proteasa que incluye una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 3. Además en el presente documento se divulga un agente de lavado o detergente, caracterizado además por que su poder de limpieza corresponde por lo menos al de un agente de lavado o detergente que incluye 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. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8. Se determina el poder de limpieza en un sistema de lavado, el cual contiene el agente de lavado que contiene una amilasa así como la proteasa, en una dosificación entre 2,0 y 9,0 gramos por litro de licor de lavado, en la que las proteasas que van a ser comparadas se usan en la misma concentración (referida a la proteína activa) y se determina el poder de limpieza frente a uno o varios de los ensuciamientos sangre-leche/tinta sobre algodón, huevo completo/pigmento (huevo completo/hollín) sobre algodón, aceite de maní-pigmento/tinta

sobre poliéster/algodón y pasto sobre algodón, en particular frente a uno o varios de los ensuciamientos

- sangre-leche/tinta sobre algodón: producto n.º C-05 obtenible de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Holanda
- huevo completo/pigmento (huevo completo/hollín) sobre algodón: producto n.º 10N obtenible de la compañía wfk Testgewebe GmbH; Brüggen-Bracht, Alemania, o producto C-S-37 obtenible de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Holanda
- aceite de maní-pigmento/tinta sobre poliéster/algodón: producto n.º PC-10 obtenible de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Holanda
- pasto sobre algodón: producto n.º 164 obtenible de la compañía Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza,

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

El agente de lavado para el sistema de lavado es un agente de lavado líquido, que está compuesto como sigue (todos los datos en porcentajes en peso): 0,3-0,5 % de xantano, 0,2-0,4 % de antiespumante, 6-7 % de glicerina, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (etersulfato de alcohol graso), 24-28 % de surfactante no iónico, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato de sodio (dihidrato), 2-4 % de soda, 14-16 % de ácidos grasos de nuez de coco, 0,5 % de HEDP (1-hidroxietano-(ácido 1,1-di-fosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de blanqueador óptico, 0-0,001 % de colorante, 0,0001-0,04 % de amilasa (proteína activa), preferiblemente Stainzyme ® (preparación de amilasa de la compañía Novozymes), el resto de agua desmineralizada. La proteasa es usada en el agente de lavado en una concentración de 0,001-0,1 %, preferiblemente de 0,01 a 0,06 %, referida a la proteína activa. La dosificación del agente de lavado líquido está entre 2,0 y 9,0, preferiblemente entre 3,0 y 8,2, entre 4,0 y 7,5 y preferido de modo particular 4,7 gramos por litro de licor de lavado. El lavado ocurre en un intervalo de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferiblemente entre pH 8 y pH 9. Ni la actividad de proteasa ni la de amilasa en el licor de lavado al comienzo de lavado son iguales a cero.

El grado de blancura, es decir el blanqueo de los ensuciamientos como medida del poder de limpieza, es determinado con métodos ópticos de medición, preferiblemente fotométricos. Un aparato adecuado para ello es por ejemplo el espectrómetro Minolta CM508d. Comúnmente, los aparatos usados para la medición son calibrados previamente con un estándar blanco, preferiblemente un estándar blanco suministrado.

En otra forma de realización de la invención, un agente de lavado o detergente se caracteriza además porque su estabilidad al almacenamiento corresponde por lo menos a la de un agente de lavado o bien detergente que contiene una proteasa, la cual incluye una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 3. Además en el presente documento se divulga un agente de lavado o detergente, además caracterizado por que su estabilidad al almacenamiento corresponde por lo menos a la de un agente de lavado o detergente que incluye 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. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8. Tal estabilidad al almacenamiento está presente entonces cuando el agente de lavado o detergente de acuerdo con la invención, después de un almacenamiento de ocho semanas a 30 °C exhibe una actividad de amilasa igual o mayor a la del agente de lavado o detergente al que se recurre para la comparación, en la que el agente de acuerdo con la invención se diferencia solo en la proteasa presente en el agente de lavado o detergente al que se recurre para la comparación.

Preferido de modo particular, el agente al que se recurre para la comparación es un agente de lavado líquido, que está compuesto como sigue (todos los datos en porcentaje peso):

Ingrediente	% en peso
Alcohol graso C_{12-18} con 7 OE	7,5
Alquilbencenosulfonato C_{10}-C_{13} lineal (sal de Na)	8,5
Ácido graso de coco (sal de Na)	14,6
Lauriletersulfato con 2 OE (sal de Na)	13,0
Ácido cítrico (sal de Na)	3,1
Ácido bórico (sal de Na)	1,0
Espesante de poliacrilato	0,4

(continuación)

Ingrediente	% en peso
Propilenglicol	2,1
Antiespumante de silicona	0,2
Amilasa (proteína activa), preferiblemente Stainzyme® 12L (preparación de amilasa de la compañía Novozymes)	0,0001-0,04
Agua hasta	100

La proteasa es usada en el agente de lavado en una concentración de 0,001-0,1 %, preferiblemente de 0,01 a 0,06 %, referida a la proteína activa.

Al comienzo del almacenamiento los dos agentes que se van a comparar exhiben la misma actividad amilolítica inicial, contienen la proteasa en la misma concentración referida a la enzima activa, y ambos agentes son tratados del mismo modo y forma. La actividad proteolítica en los agentes es determinada en cada caso mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) desde el sustrato suc-AAPF-pNA, y su actividad amilolítica es determinada en cada caso como se indicó anteriormente.

Las actividades iniciales para la proteasa y la amilasa en los respectivos agentes no son iguales a cero.

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

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

Numerosas proteasas y en particular subtilisinas son formadas como denominadas preproteínas, por consiguiente junto con un propéptido y un péptido de señal, en las que la función del péptido de señal comúnmente consiste en la transferencia al exterior de la proteasa desde la célula que la produce, al periplasma o al medio circundante de la célula, y el propéptido es comúnmente necesario para el correcto pliegue de la proteasa. Por regla general el péptido de señal y el propéptido son la parte terminal en N de la preproteína. Bajo condiciones naturales, el péptido de señal es escindido por una señalpeptidasa de la otra proteasa. A continuación ocurre el pliegue correcto final de la proteasa promovido por el propéptido. La proteasa está entonces en su forma activa y escinde el propéptido en sí mismo. Después de la decisión del propéptido ejerce la proteasa entonces madura (madura), en particular subtilisina, su actividad catalítica sin los aminoácidos terminales en N originalmente presentes. Para aplicaciones técnicas, en general y en particular en el marco de esta invención, se prefieren las proteasas maduras (maduras), es decir las enzimas procesadas después de su producción, frente a las preproteínas. Las proteasas pueden además ser modificadas de las células que las producen después de la producción de la cadena de polipéptidos, por ejemplo mediante el enlace de moléculas de azúcar, adición del grupo formilo, adición de grupo amino, etc. Tales modificaciones son modificaciones postranslacionales y pueden, sin embargo no tienen que, ejercer una influencia en la función de la proteasa.

Además, también la proteasa madura puede acortarse en sus extremos terminales en N y/o terminales en C, de modo que en el agente de lavado o detergente de acuerdo con la invención está presente una proteasa corta, por consiguiente un fragmento, respecto a SEQ ID NO. 1 o bien 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 ese caso a los ámbitos en los cuales el respectivo fragmento está asignado en una alineación con SEQ ID NO. 1. El respectivo fragmento comprende en cada caso la posición, que está asignada a la posición 99 en una alineación con SEQ ID NO. 1, y exhibe en esta posición un aminoácido correspondiente. Ventajosamente comprende también una o varias de las otras posiciones anteriormente descritas y exhibe allí un aminoácido correspondiente. Además, un fragmento así es proteolíticamente activo. Un fragmento más preferido a este respecto comprende una secuencia de aminoácidos que en 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 conectados 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 bajo consideración de los aminoácidos previamente mencionados para la posición 99 y opcionalmente además para las posiciones 3 y/o 4 y/o 61 y/o 154 y/o 188 y/o 193 y/o 199 y/o 211. Preferido de modo particular, el poder de limpieza y/o estabilidad al almacenamiento de un agente de lavado o detergente líquido acuerdo con la invención con un fragmento así, corresponde por lo menos al de un agente de lavado o detergente que contiene una proteasa la cual incluye 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 en cada caso como se indicó previamente.

Otro objetivo de la invención es un agente de lavado o detergente líquido que comprende

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

a. Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 3;
b. Proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 3, en la que el cambio de la numeración según SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. Treonina en la posición 3 (3T),
ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 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),
viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211D, 211E o 211G),
ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

(b) una amilasa.

En el presente documento se divulga además un agente de lavado o un detergente líquido que comprende

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

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8;
b. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8, en donde la modificación de la numeración según SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. treonina en la posición 3 (3T),
ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 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),
viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211D, 211E o 211 G),
ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

(b) una amilasa.

Estas proteasas son usadas de modo muy particularmente preferido en un agente de lavado o detergente líquido de acuerdo con la invención. Ellas son obtenidas partiendo de SEQ ID NO. 1 mediante la sustitución del aminoácido arginina en la posición 99 por el aminoácido ácido asparagínico (D) en la numeración según SEQ ID NO. 1. Esta secuencia de aminoácidos es indicada en el protocolo de secuencia como SEQ ID NO. 3. Las proteasas divulgadas además en el presente documento se obtienen partiendo de SEQ ID NO. 1 mediante la sustitución del aminoácido arginina en la posición 99 por el aminoácido ácido glutámico (E) o el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q) o el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S) en la numeración según SEQ ID NO. 1. Estas secuencias de aminoácidos son indicadas en el protocolo de secuencia como SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y SEQ ID NO. 8. Además, estas proteasas, adicionalmente al aminoácido previsto para la posición 99, pueden exhibir uno o varios de los aminoácidos explicados anteriormente, en las posiciones 3, 4, 61, 154, 188, 193, 199 y 211, asignarse en una alineación con SEQ ID NO. 1 y con ello con la numeración según SEQ ID NO. 1. Los aminoácidos mencionados para estas posiciones causan también en estas proteasas otras propiedades ventajosas y/o fortalecen aún propiedades ya existentes. En particular causan una elevación de la actividad proteolítica y/o la estabilidad de la proteasa en un agente de lavado o detergente líquido o bien en el licor de lavado formado por este agente de lavado o detergente. Todas las realizaciones anteriores - en tanto sean aplicables - son válidas de modo correspondiente para estas proteasas preferidas de modo particular.

Un agente de acuerdo con la invención contiene la proteasa de modo creciente preferiblemente en una cantidad de 1 x 10^{-8}-5 % en peso, de 0,0001-1 % en peso, de 0,0005-0,5 % en peso, de 0,001 a 0,1 % en peso y preferido de modo particular de 0,001 a 0,06 % en peso, referido a la proteína activa. Un agente de acuerdo con la invención contiene la amilasa de manera creciente preferiblemente en una cantidad de 1 x 10^{-8}-5 % en peso, de 0,00001-1 % en peso, de 0,00005-0,5 % en peso, de 0,0001 a 0,1 % en peso y preferido de modo particular de 0,0001 a 0,05 % en peso, referido a la proteína activa. La concentración de proteína puede ser determinada con ayuda de métodos conocidos, por ejemplo el método BCA (ácido bicincónico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el método del Biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), pp. 751-766). La determinación de la concentración de proteína activa ocurrió respecto a esto mediante una titulación de los centros activos usando un inhibidor irreversible adecuado (para proteasas por ejemplo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) y determinación de la actividad residual (véase M. Bender et al., J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), pp. 5890-5913).

Además, la proteasa y/o la amilasa pueden estar adsorbidas en sustancias soporte y/o incorporadas en sustancias de envoltura, para protegerlas contra la inactivación prematura. En el licor de lavado, por consiguiente bajo condiciones de uso, se libera entonces la enzima y puede desarrollar su efecto catalítico.

En otra forma de realización de la invención, el agente de lavado o detergente se caracteriza porque incluye 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 determinó que la adición de tales sustancias mejora adicionalmente el poder de limpieza de los agentes de lavado y detergentes, en particular de agentes de lavado o detergentes líquidos que contienen proteasas y amilasas, en particular aquellos descritos anteriormente, 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. En particular en combinación con una proteasa que va a ser usada de acuerdo con la invención ocurre un efecto sinérgico, sobre todo respecto a la eliminación de por lo menos un ensuciamiento sensible a proteasa, en particular uno tal como se indicó anteriormente.

Las sustancias indicadas anteriormente 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 cargado negativamente, preferiblemente con vanos monómeros cargados negativamente. Por ello, de acuerdo con la invención preferiblemente este polímero es un polímero con carga negativa. Por ejemplo se prefieren polímeros de ácidos orgánicos o bien sales, en particular poliacrilatos y/o poli- ácidos de azúcar y/o copolímeros de poliacrilato y/o copolímeros de poli-azúcar. Respecto a esto, todos los 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 Termfos), ácido algínico, ácido poli-2-acrilamido-2-metil-1-propansulfónico, sal de sodio de ácido poli-4-estirenosulfónico-co- ácido maleico, sal de sodio de ácido poli-acrilamido-co-acrílico, sal de sodio de ácido poli-metacrílico, poli-metilvinileter-alt ácido maleico o sales de sodio de ácido polivinilsulfónico.

Las sustancias indicadas bajo ii. son sustancias catiónicas o policatiónicas, es decir estas sustancias portan por lo menos una y preferiblemente varias cargas positivas. Preferiblemente son 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. Ejemplos de compuestos preferidos a este respecto son sales de las poliaminas, polietileniminas o bien sus copolímeros, sales de las polialilaminas, sales de los compuestos de polidialildimetilamonio o compuestos de poli(acrilamida-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 sitio se hace referencia expresa a que una sustancia concreta puede corresponder a uno o varios de los grupos i. a iii. mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede ser un polímero aniónico que exhibe uno o varios grupo(s) hidroxilo, y/o polihidroxilo. Una sustancia tal está relacionada entonces con los grupos i. y iii. Así mismo,

un polímero catiónico, que exhibe uno o varios grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo, se relaciona con los grupos ii. y iii.

Así mismo, en el marco de la presente invención son utilizables derivados de las sustancias previamente mencionadas, relacionadas con i., ii. o iii.. En el sentido del presente documento se entiende por un derivado una sustancia tal que proviniendo de una de las sustancias mencionadas, está modificada químicamente, por ejemplo mediante la transformación de una cadena lateral o por enlace covalente de otro compuesto a la sustancia. Tal compuesto puede ser por ejemplo un compuesto de bajo peso molecular como lípidos o mono-, oligo o polisacáridos o aminas o bien compuestos amino. Además la sustancia puede ser glicosilada, hidrolizada, oxidada, N-metilada, N-formilada, N-acetilada o contener metilo, formilo, etilo, acetilo, t-butilo, anisilo, bencilo, trifluroacetilo, N-hidroxisuccinimida, t-butilxicarbonilo, benzoilo, 4-metilbencilo, tioanicilo, tiocresilo, benciloximetilo, 4-nitrofenilo, benciloxicarbonilo, 2-nitrobenzoilo, 2-nitrofenilsulfenilo, 4-toluensulfonilo, pentafluorofenilo, difenilmetilo, 2-clorobenciloxicarbonilo, 2,4,5-triclorofenilo, 2-bromobenciloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, trifenilmetilo, 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo. Así mismo, se entiende por un derivado la unión covalente o no covalente de la sustancia a un soporte macromolecular, al igual que también una inclusión no covalente en estructuras de jaula macromoleculares adecuadas. También pueden hacerse acoplamientos con otros compuestos macromoleculares, como tal vez polietilenglicol. Otras modificaciones químicas preferidas son la modificación de uno o varios de los grupos químicos -COOH, -OH, =NH, $-NH_2$ –SH hasta -COOR, -OR, -NHR, -NR2, -NHR, -NR, -SR; en los que:

R es -CH=CH-R2, -C≡C-R2, -C(R2)=CH_2, -C(R2)=C(R3), -CH=NR2, -C(R2)=N-R3, un sistema de anillo de 4-7 átomos de C con o sin institución, un heterociclo 4-7 con nitrógeno con o sin sustitución, o una cadena C_2 a C_8 con 1 a 5 enlaces dobles o triples con sustituciones elegidas de R1, R2, o R3, en las que
- R1 es H, -R, -NO_2, -CN, sustituyente halogenuro, -N3, alquilo -C_{1-8}, -$(CH_2)_nCO_2R2$, alquilo -C_{2-8}-CO_2R2 -$O(CH_2)_nCO_2R2$, -C(O)NR2R3, -P(O)(OR2)2, tetrazol-5-il sustituido con alquilo, arilo -$(CH_2)_nO(CH_2)_n$, -NR2R3, -$(CH2)_n$ OR2, -$(CH2)_n$ SR2, -N(R2)C(O)R3, -S(O2)NR2R3, -N(R2)S(O_2)R3, -$(CHR_2)_n$ NR2R3, -C(O)R3, $(CH_2)_nN(R3)C(O)R3$, -N(R2)CR2R3, cicloalquilo $(CH_2)_n$- sustituido o no sustituido, fenilo o ciclo $(CH_2)_n$- sustituido o no sustituido; en los que n es un número mayor a 1;
- R2 es H, sustituyente halogenuro, -alquilo, -haloalquilo, fenilo-$(CH_2)_n$, 1-3-bifenilo-(CH_2), -(CH_2)1-4-Ph-N(SO_2-alquilo $C_{1-2})_2$, -CO(CHR1)$_n$-OR1, heterociclo-$(CHR1)_n$, -$(CHR1)_n$-NH-CO-R1, -$(CHR1)_n$-NH-SO_2R1, -$(CHR1)_n$-Ph-N(SO_2-alquilo$C_{1-2})_2$, -$(CHR1)_n$-C(O)(CHR1)-NHR1, -$(CHR1)_n$-C(S)(CHR1)-NHR1, -$(CH2)_nO(CH2)_nCH_3$, -CF_3, acilo-C_2-C_5, -$(CHR1)_n$OH, -$(CHR1)_nCO_2$R1, alquilo-$(CHR1)_n$-O, alquilo-$(CHR1)_n$-O-$(CH_2)_n$-O, alquilo-$(CHR1)_n$-S-, alquilo-$(CHR1)_n$-S(O), alquilo-$(CHR1)_n$-S(O2), -$(CHR1)_n$-S(O_2)-NHR3, -$(CHR3)_n$-N3, -$(CHR3)_n$NHR4, una cadena C_2 a C_8 cadena de alqueno con 1 a 5 dobles enlaces, una cadena C_2 a C_8 cadena de alquino con 1 a 5 enlaces triples, heterociclo -$(CHR3)_n$ sustituido o no sustituido, cicloalquilo -$(CHR3)_n$ sustituido o no sustituido saturado o no saturado; en los que n es un número mayor a 1 y R1 y R3 pueden ser iguales o diferentes;
- R3 es H, -OH, -CN, alquilo sustituido, alquenilo - C_2 a C_8, cicloalquilo sustituido o no sustituido, -N(R1)R2, heterociclo o heterobiciclo C_5 a C_7 saturado o no saturado de 4 a 7 átomos de C, -NR1, -NR2, -NR1R2 consistente en un heterociclo o heterobiciclo saturado o no saturado de 4 a 7 átomos de C;
- R4 es H, -(CH2)$_n$OH, -C(O)OR5, -C(O)SR5, -$(CH_2)_n$ C(O)NR6R7, -O-C(O)-O-R6, un aminoácido o un péptido; en los que n es un número entre 0 y 4; -R5 es H,
- R6 es -C(R7)-$(CH_2)_n$-O-C(O)-R8, -$(CH_2)_n$-C(R7)-O-C(O)R8, -$(CH_2)_n$-C(R7)-O-C(O)-O-R8, o -C(R7)-$(CH_2)_n$-O-C(O)-O-R8; en los que n es un número entre 0 y 4; y
- R7 y R8 son en cada caso H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, o alquilo CH_2CO_2 en los que R7 y R8 puede ser iguales o diferentes.

De acuerdo con la invención, es factible además usar todas las combinaciones posibles de las sustancias previamente mencionadas como correspondientes a i., ii. o iii. y/o sus derivados.

Un agente de lavado o detergente líquido de acuerdo con la invención puede ser usado como tal o después de dilución con agua, para la limpieza de textiles y/o superficies duras. Una dilución así puede ser hecha fácilmente, en lo cual se diluye una cantidad medida del agente en otra cantidad de agua, en relaciones determinadas en peso de agente: agua y opcionalmente se sacude esta dilución, para asegurar una distribución homogénea del agente en el agua. Son posibles relaciones en peso o volumen de la dilución de 1:0 agente: agua a 1:10.000 o 1:20.000 agente: agua, preferiblemente de 1:10 a 1:2.000 agente: agua.

Como agente de lavado o detergente líquidos pueden servir para esto todas las formas de administración líquida o bien capaces de fluir. En el sentido el presente documento "capaces de fluir" son al respecto agentes que pueden ser vertidos y pueden exhibir viscosidades de hasta varios 10.000 mPas. La viscosidad puede ser medida con métodos estándar comunes (por ejemplo viscosímetro de Brookfield LVT-II a 20 rpm y 20 °C, aguja 3) y está preferiblemente en el intervalo de 5 a 10.000 mPas. Los agentes preferidos viscosidades de 10 a 8.000 mPas, en las que se prefieren de modo particular valores entre 120 a 3.000 mPas. En el marco de la presente invención, un

agente de lavado o detergente líquido puede por ello estar en forma de gel o de pasta, puede estar presente como solución o suspensión homogénea, así como por ejemplo puede poder ser atomizado o estar preparado en otras formas comunes de administración. Entre los agentes de lavado se cuentan todos los tipos de agentes de lavado imaginables, en particular agentes de lavado para textiles, alfombras o fibras naturales. Ellos pueden ser previstos para uso manual y/o también en máquina. Entre los agentes de lavado se cuentan además agentes auxiliares para el lavado, que pueden ser dosificados al verdadero agente de lavado para el lavado de textiles manual o en máquina, para alcanzar otros efectos. Entre los detergentes se cuentan los agentes para la limpieza y/o desinfección de superficies duras, agentes de enjuague manual y en máquina de vajillas, limpiadores de alfombra, agentes para fregar, limpiadores de vidrio, enjuagues aromáticos para sanitarios, etc., así mismo que ocurren en todas las formas de administración conjunta mencionadas. Finalmente los agentes para el tratamiento previo y posterior de textiles son por un lado aquellos agentes con los cuales es puesta en contacto la pieza que se va a lavar, antes del verdadero lavado, por ejemplo para disolver ensuciamientos duros pertinaces, y por otro lado aquellos que en una etapa subsiguiente del verdadero lavado de textiles imparten a un material que se está lavando otras propiedades deseables como sensación agradable al tacto, ausencia de arrugas o baja carga estática. Entre estos últimos agentes mencionados se cuentan entre otros los suavizantes. Son agentes de desinfección por ejemplo desinfectantes de manos, desinfectantes de recipientes y desinfectantes de instrumentos que así mismo ocurren en las formas mencionadas de administración.

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

Los fosfonatos son sales y compuestos orgánicos, en particular ésteres, del ácido fosfónico. Como sales existen fosfonatos primarios ($M'H_2PO_3$ o bien $HP(O)(OH)(OM')$) y secundarios (M'_2HPO_3 o bien $HP(O)(OM')_2$), en los que M' representa un metal monovalente. Éstos fosfonatos inorgánicos son denominados también fosfitos primarios o bien secundarios. Los fosfonatos inorgánicos surgen por ejemplo por reacción de ácido fosfónico $HP(O)(OH)_2$, en particular la forma del tautómero estable del ácido fosforoso con una (primario) o dos bases equivalentes (secundario), 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 $R1P(O)(OR2)_2$, con R1 y/o R2 = alquilo, arilo o H, en la que los radicales alquilo o bien arilo pueden exhibir otras sustituciones o pueden portar otros grupos químicos. Los fosfonatos orgánicos sustituidos en P surgen por ejemplo por reacción de Michaelis-Arbusov. Muchos de estos fosfonatos son solubles en agua. Algunos fosfonatos técnicamente importantes portan además grupo(s) amino en el tipo $NR-(CH_2)_x-PO(OH)_2$ (R = alquilo, arilo o H). Algunos de estos aminofosfonatos tienen similitudes estructurales con formadores de complejos como EDTA, NTA o DTPA y tienen una función similar. En el marco de la presente invención, entre los fosfonatos preferidos de modo particular se cuentan en particular organofosfonatos como por ejemplo ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido aminotri(metilenfosfónico) (ATMP, también denominado como ácido amino-tris(metilenfosfónico) o bien ácido nitrilotris(metilenfosfónico) (NTMP)), ácido dietilentriamino-penta(metilenfosfónico) (DTPMP o DETPMP o DTPNT), ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP, también denominado como ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) así como ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tri carboxílico (PBS-AM, también denominado como ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico o bien ácido 3-carboxi-3-fosfonoadípico), que son usados mayormente en forma de su sal de amonio o metal alcalino. Preferido de modo particular es ácido dietilentriamino-penta(metilenfosfónico)-sodio. Un fosfonato tal es por ejemplo obtenible bajo el nombre comercial Dequest® 2066 (compañía Termphos).

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

Como surfactante(s) pueden usarse surfactantes aniónicos, no iónicos, zwiteriónicos y/o anfóteros. Desde el punto de vista de la aplicación técnica se prefieren mezclas de surfactantes aniónicos y no iónicos. El contenido total de surfactante del agente de lavado o detergente líquido está preferiblemente por debajo de 60 % en peso y preferido de modo particular por debajo de 45 % en peso, referido a la totalidad del agente de lavado o detergente líquido.

Los surfactantes no iónicos adecuados incluyen 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 surfactantes no iónicos se usan preferiblemente alcoholes en particular primarios alcoxilados, de modo ventajoso etoxilados, con preferiblemente 8 a 18 átomos de C y en promedio 1 a 12 mol de óxido de etileno (EO) por mol de alcohol, en los cuales el radical alcohol puede ser lineal o preferiblemente en la posición 2 ramificado con metilo, o bien puede contener en la mezcla radicales lineales y ramificados con metilo, así como están presentes comúnmente en radicales oxoalcohol. Sin embargo se prefieren en particular alcoholetoxilatos con

radicales lineales de alcoholes de origen nativo con 12 a 18 átomos de C, por ejemplo de alcohol de coco, palma, grasa de sebo u oleilalcohol, y en promedio 2 a 8 OE por mol de alcohol. A los alcoholes etoxilados preferidos pertenecen por ejemplo alcoholes C_{12-14} con 3 OE, 4 OE o 7 OE, alcohol C_{9-11} con 7 OE, alcoholes C_{13-15} con 3 OE, 5 OE, 7 OE o 8 OE, alcoholes C_{12-18} con 3 OE, 5 OE o 7 OE y mezclas de estos, como mezclas de alcohol C_{12-14} con 3 OE y alcohol C_{12-18} con 7 OE. Los grados indicados de etoxilación representan valores promedio estadísticos, que para un producto especial pueden ser un número entero o fraccionario. Los alcoholetoxilatos preferidos exhiben una distribución homóloga estrecha (etoxilatos de intervalo estrecho, NRE). Adicionalmente a estos surfactantes no iónicos pueden usarse también alcoholes grasos con más de 12 OE. Son ejemplo de ello el alcohol de sebo con 14 OE, 25 OE, 30 OE o 40 OE. También pueden ser utilizados de acuerdo con la invención surfactantes no iónicos, que contienen grupos EO y PO juntos en la molécula. Es adecuada además también una mezcla de un alcohol graso etoxilado ramificado (más fuerte) y un alcohol graso etoxilado no ramificado, como por ejemplo una mezcla de un alcohol graso C_{16-18} con 7 OE y 2-propilheptanol con 7 OE. En particular, preferiblemente el agente de lavado, detergente, agente de tratamiento posterior o agente auxiliar de lavado contiene como surfactante no iónico un alcohol graso C_{12-18} con 7 OE o un oxoalcohol C_{13-15} con 7 OE.

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

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

Como surfactantes del tipo sulfonato entran en consideración al respecto preferiblemente alquilbencenosulfonatos C_{9-13}, olefinsulfonatos, es decir mezclas de alquen- e hidroxialcanosulfonatos así como disulfonatos, como se obtienen por ejemplo a partir de monoolefinas C_{12-18} con doble enlace terminal o interior, mediante sulfonación con trióxido de azufre gaseoso y subsiguiente hidrólisis alcalina o ácida del producto de sulfonación. Son adecuados también alcanosulfonatos C_{12-18} y los ésteres de ácidos α-sulfograsos (estersulfonatos), por ejemplo los metilésteres α-sulfonados de los ácidos grasos hidrogenado de coco, núcleo de palma o 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}-C_{18}, por ejemplo de alcohol graso de coco, alcohol graso de sebo, lauril-, miristil-, cetil- o estearilalcohol o los oxoalcoholes C_{10}-C_{20} y los semiésteres de alcoholes secundarios de estas longitudes de cadena. De interés técnico en el lavado se prefieren los alquilsulfatos C_{12}-C_{16} y alquilsulfatos C_{12}-C_{15} así como alquilsulfatos C_{14}-C_{15}. También los 2,3-alquilsulfatos son surfactantes aniónicos adecuados.

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

Son surfactantes aniónicos preferidos también jabones. Son adecuados los jabones de ácidos grasos saturados e insaturados, como las sales del ácido laurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido erúcico (hidrogenado) y ácido behénico así como en particular de ácidos grasos naturales, por ejemplo mezclas de jabones derivados de ácidos grasos de coco, núcleo de palma, aceite de oliva y grasa de sebo.

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

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

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

Los materiales estructurales orgánicos que pueden estar presentes en el agente de lavado o detergente son por ejemplo los ácidos policarboxílicos útiles en forma de sus sales de sodio, en los que por ácidos policarboxílicos se entienden aquellos ácidos carboxílicos que portan más de una función ácido. Son ejemplos de esto 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 descendientes 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 materiales estructurales son adecuados además policarboxilatos poliméricos. Éstos 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 pueden preferirse de este grupo nuevamente los poliacrilatos de cadena corta, que exhiben masas molares de 1.000 a 10.000 g / mol, y preferido de modo particular de 1.000 a 5.000 g / mol.

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

No obstante, en el agente de lavado o detergente líquido se usan preferiblemente materiales estructurales solubles, como por ejemplo ácido cítrico, o polímeros acrílicos con una masa molar de 1.000 a 5.000 g / mol preferiblemente.

En el sentido de este documento, las masas molares indicadas para los policarboxilatos poliméricos son promedio aritmético de masas molares M_w de las respectivas formas ácidas, que fueron determinadas básicamente por medio de cromatografía de permeación de gel (GPC), en la que se usó un detector UV. Al respecto, la medición ocurrió contra un estándar externo de ácido poliacrílico, el cual debido a su semejanza estructural con los polímeros investigados suministra valores realistas de peso molecular. Estos datos se desvían claramente de los datos de peso molecular, en los cuales se usan como estándar ácidos poliestirenosulfónicos. Las masas molares medidas contra ácidos poliestirenosulfónicos son por regla general claramente más altas que las masas molares indicadas en este documento.

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

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

Para el ajuste de un valor deseado de pH, que no surge en sí mismo por la mezcla de los otros componentes 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 hidróxido de amonio o alcalinos. Tales reguladores de pH están presentes en los agentes en cantidades preferiblemente no mayores a 20 % en peso, en particular de 1,2 % en peso a 17 % en peso.

En el sentido de la invención, un agente puede contener además una o varias 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 útiles son elegidas preferiblemente de entre el grupo que incluye halogenuros, sulfatos, sulfitos, carbonatos, hidrogenocarbonatos, nitratos, nitritos, fosfatos y/u óxidos de los metales alcalinos, de los metales alcalinotérreos, de aluminio y/o de los metales de transición, incoloros solubles en agua; además, pueden utilizarse sales de amonio. Al respecto, son preferidos de modo particular los halogenuros y sulfatos de los metales alcalinos; por ello preferiblemente se elige la sal inorgánica de entre el grupo que incluye cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, sulfato de potasio así como mezclas de los mismos. Son sales orgánicas que pueden ser utilizadas por ejemplo sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos, de amonio, de aluminio, y/o de

metales de transición de los ácidos carboxílicos, incoloras solubles en agua. Preferiblemente se eligen las sales del grupo que comprenden formiato, acetato, propionato, citrato, malato, tartrato, succinato, malonato, oxalato, lactato así como mezclas de los mismos.

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

De modo alternativo o complementario pueden usarse también (co)polímeros de ácido (met)acrílico como agente espesante. Los (co)polímeros adecuados de ácido acrílico y ácido (met)acrílico comprenden por ejemplo los homopolímeros de alto peso molecular del ácido acrílico entrecruzados con un polialquenilpoliéter, en particular un aliléter de sacarosa, pentaeritritol o propileno (denominación INCI según "International Dictionary of Cosmetic Ingredients" de "The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA)": Carbomer), 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 del ácido acrílico, ácido metacrílico y sus ésteres sencillos formados preferiblemente con alcanoles C_{1-4} (INCI Copolímeros de acrilato), que son obtenibles por ejemplo bajo los nombres comerciales Aculyn®, Acusol® o Tego® Polymer; (ii) Copolímeros entrecruzados de alto peso molecular de ácido acrílico, a los cuales pertenecen por ejemplo los copolímeros de alquilacrilatos entrecruzados con un aliléter de sacarosa o de pentaeritritol, con uno o varios monómeros del grupo del ácido acrílico, ácido metacrílico y sus ésteres sencillos formados preferiblemente con alcanoles C_{1-4} (INCI polímero cruzado de acrilato/alquilacrilato C_{10-30}) y que son obtenibles por ejemplo bajo el nombre comercial Carbopol®. Otros polímeros adecuados son (co)polímeros de ácido (met)acrílico del tipo Sokalan®.

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

Por regla general, los agentes de acuerdo con la invención líquidos o pastosos en forma de soluciones que contienen solventes corrientes, son producidos comúnmente mediante mezcla simple de los ingredientes, los cuales pueden ser añadidos puros o como solución en un mezclador automático.

Los agentes de lavado o detergentes de acuerdo con la invención pueden contener exclusivamente una proteasa y una amilasa, como se describió. De modo alternativo, ellos también contienen otra enzima hidrolítica u otra enzima en una concentración conveniente para la eficacia del agente. Con ello, otro objetivo de la invención representa agentes que comprenden además una o varias otras enzimas, en las que en principio son utilizables todas las enzimas establecidas en el estado la técnica para este propósito. Como otra enzima preferiblemente utilizable están todas las enzimas que pueden desarrollar en el agente de acuerdo con la invención una actividad catalítica, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, ß-glucosidasa, pectinasa, carrageninasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa, así como sus mezclas. Otras enzimas están presentes en el agente de manera ventajosa en cada caso en una cantidad de 1×10^{-8} a 5 por ciento en peso referido a la proteína activa. De modo creciente preferiblemente cada otra enzima está presente en los agentes de acuerdo con la invención en una cantidad de 1×10^{-7}-3 % en peso, de 0,00001-1 % en peso, de 0,00005-0,5 % en peso, de 0,0001 a 0,1 % en peso y preferido de modo particular de 0,0001 a 0,05 % en peso, referido a la proteína activa. De modo particular, preferiblemente la enzima muestra poder sinérgico de limpieza frente a determinados ensuciamientos o manchas, es decir, las enzimas presentes en la composición del agente se apoyan mutuamente en su poder de limpieza. Preferido de modo muy particular, existe una sinergia tal entre la proteasa presente de acuerdo con la invención y otra enzima de un agente acuerdo con la invención, entre ellas en particular entre la proteasa mencionada y la amilasa y/o una lipasa y/o una mananasa y/o una celulasa y/o una pectinasa. Pueden ocurrir efectos sinérgicos no solo entre diferentes enzimas, sino también entre una o varias enzimas y otros ingredientes del agente de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la invención representa el uso de un agente de lavado o detergente de acuerdo con la invención, para la eliminación de ensuciamientos, en particular de ensuciamientos sensibles a proteasa y/o amilasa, sobre textiles o superficies duras, es decir para la limpieza de textiles o superficies duras. Entonces los agentes de acuerdo con la invención pueden, en particular debido a la combinación presente de proteasa y amilasa, ser usados de manera ventajosa para eliminar de textiles o de superficies duras correspondientes contaminantes. Las

formas de realización de este objetivo de la invención representan por ejemplo el lavado de manos, la eliminación manual de manchas en textiles o de superficies duras o el uso en conexión con un método mecánico. Todas las circunstancias, objetivos y formas de realización que se describen para agentes de lavado o detergentes de acuerdo con la invención, son aplicables también para este objetivo de la invención. Por ello en este punto se remite expresamente a la divulgación de correspondientes posiciones, con la evidencia de que esta divulgación también es válida para el uso de acuerdo con la invención precedente.

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

Bajo él caen tanto los métodos manuales como también los mecánicos, en los que se prefieren los métodos mecánicos, debido a su capacidad para ser controlados de manera precisa, lo cual concierne por ejemplo a las cantidades y tiempos de aplicación empleados. Los métodos para la limpieza de textiles se distinguen en general porque en varias etapas del método se aplican sobre el objeto de limpieza diferentes sustancias con actividad limpiadora y después del tiempo de aplicación se friegan, o porque el objeto de limpieza es tratado de otro modo con un agente de lavado o una solución o bien dilución de este agente. De modo correspondiente es válido para métodos para la limpieza de todos los otros materiales diferentes a textiles, en particular de superficies duras. Todos los métodos imaginables de lavado o limpieza pueden ser enriquecidos en al menos una de las etapas del método, en la aplicación de un agente de lavado o detergente de acuerdo con la invención y representan entonces formas de realización de la presente invención. Todas las circunstancias, objetivos y formas de realización, que se describen para los agentes de lavado o detergentes de acuerdo con la invención, son también aplicables para este objetivo de la invención. Por ello en este punto se remite expresamente a la divulgación de correspondientes posiciones, con la evidencia de que esta divulgación también es válida para el método de acuerdo con la invención precedente.

En una forma preferida de realización, el método se caracteriza porque la amilasa en el licor de lavado está presente en una concentración de 0,0000003 a 0,0004 % en peso, preferiblemente de 0,0000005 a 0,0003 % en peso, y/o porque la proteasa en el licor de lavado está presente en una concentración de 0,00009 a 0,0005 % en peso, preferiblemente de 0,00015 a 0,00035 % en peso, en la que los datos están referidos sobre proteína activa. En otra forma preferida de realización, el método se caracteriza porque es ejecutado a una temperatura entre 10 °C y 50 °C, preferiblemente entre 10 °C y 40 °C y preferido de modo particular entre 20 °C y 40 °C.

Las proteasas usadas en los agentes de acuerdo con la invención, son utilizables de modo correspondiente con las realizaciones precedentes de manera ventajosa en agentes de lavado y detergentes de acuerdo con la invención así como en métodos, en particular métodos de lavado y limpieza. Ellas pueden ser usadas por consiguiente de manera ventajosa para poner a disposición una actividad proteolítica en agentes correspondientes.

Por ello otro objetivo de la invención forma el uso de una proteasa, (a1) que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en al menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido ácido asparagínico (D), para proporcionar una actividad proteolítica en un agente de lavado o detergente líquido, el cual comprende además una amilasa.

Además, en el presente documento se divulga 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 según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido ácido glutámico (E), o
(a2) que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q), o
(a3) que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 80 % a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 y que en la posición 99 en la numeración según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S),
para proporcionar una actividad proteolítica en un agente de lavado o un detergente líquido, que comprende además una amilasa.

En otra forma de realización, esta aplicación se caracteriza porque la proteasa exhibe además en la numeración según 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),
(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).

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

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 3;
b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 3, en la que la modificación de la numeración según SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo que consiste en:

i. treonina en la posición 3 (3T),
ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 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),
viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211D, 211E o 211G),
ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

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

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

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8;
b. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8, en donde la modificación de la numeración según SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. treonina en la posición 3 (3T),
ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 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),
viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211D, 211E o 211 G),
ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

para proporcionar una actividad proteolítica en un agente de lavado o un detergente líquido, que comprende además una amilasa.

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

Ejemplo: determinación de la estabilidad al almacenamiento de agentes de lavado líquidos de acuerdo con la invención

Como recetas base para agente de lavado sirvieron
a) Un primer agente de lavado líquido de la siguiente composición (todos los datos en porcentajes en peso): 0,3-0,5 % de xantano, 0,2-0,4 % de antiespumante, 6-7 % de glicerina, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (alcohol graso etersulfato), 24-28 % de surfactante no iónico, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato de sodio (dihidrato), 2-4 % de soda, 14-16 % de ácidos grasos de nuez de coco, 0,5 % de HEDP (ácido 1-hidroxietano-(1,1-di-fosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de blanqueador óptico, 0-0,001 % de colorante, el resto en agua desmineralizada. Como amilasa estaba presente 0,44 % en peso de Stainzyme® 12L (preparación de amilasa de la compañía Novozymes).
b) un segundo agente de lavado líquido de la siguiente composición:

(continuación)

Ingrediente	% en peso
Alcohol graso C_{12-18} con 7 OE	7,5
Alquilbencenosulfonato C_{10}-C_{13} lineal (sal de Na)	8,5
Ácido graso de coco (sal de Na)	14,6
Lauriletersulfato con 2 OE (sal de Na)	13,0
Ácido acético (sal de Na)	3,1
Ácido bórico (sal de Na)	1,0
Espesante de poliacrilato	0,4
Propilenglicol	2,1
Antiespumante de silicona	0,2
Preparación de amilasa Stainzyme® 12L (compañía Novozymes)	0,16
Agua	Hasta 100

Las recetas base de agente de lavado fueron reemplazadas para las diferentes cargas de ensayo con las siguientes proteasas, en las que los datos están referidos a proteína activa:

Carga 1: Variante F49 mejorada en poder de la proteasa de Bacillus lentus según WO 95/23221 (Arg en la posición 99 (99R)): 0,4 mg/ml (0,04 % en peso) en el agente dirigido de lavado según a) y b).
Carga 2: Proteasa, que se divulga en la figura 2 o bien SEQ ID NO. 3 del documento WO 03/057713 (Ser en la posición 99 (99S; identidad hacia SEQ ID NO. 1 < 80 %): 0,4 mg/ml (0,04 % en peso) en el agente de lavado líquido según a), 0,3 mg/ml (0,03 % en peso) en el agente de lavado líquido según b).
Carga 3: Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 2 (Glu en la posición 99 (99E)): 0,4 mg/ml (0,04 % en peso) en el agente de lavado líquido según a), 0,3 mg/ml (0,03 % en peso) en el agente de lavado líquido según b).

Se examinó el agente de lavado según las respectivas cargas 1, 2 y 3 respecto a su estabilidad al almacenamiento. Para ello se almacenó el agente de lavado a una temperatura de 30 °C por los intervalos de tiempo indicados en cada caso y se determinó la respectiva actividad amilolítica residual. Se incubaron bajo condiciones definidas de reacción (amortiguador de tris-maleato pH 6,5, 50 °C, 15 minutos) las muestras objeto de ensayo con 0,67 % de almidón (soluble, tratado previamente según Zulkowsky (tratado con glicerina a 190 °C)). Mediante adición de ácido dinitrosalicílico y calentamiento a 100 °C se redujo éste con glucosa y otro azúcar reductor bajo condiciones alcalinas, hasta un colorante rojo naranja, el cual fue determinado fotométricamente a 540 nm, después de terminar la reacción. La cantidad de azúcar liberado correspondiente al color, es al respecto una medida de la actividad enzimática (véase Sumner et al., J. Biol. Chem., 1921, 47 & 1924, 62). Las actividades amilolíticas residuales obtenidas se indican en la siguiente tabla 1 (n.d. = no determinado).
Tabla1:

Agente de lavado según	a)			b)	
	Inicio	4 Semanas	8 Semanas	Inicio	8 Semanas
Carga 1	100 %	66 %	52 %	100 %	5 3 %
Carga 2	100 %	n.d.	68 %	100 %	73 %
	Inicio	4 Semanas	8 Semanas	Inicio	8 Semanas
Carga 3	100 %	83 %	69 %	100 %	98 %

Es claro que el agente de lavado de acuerdo con la invención exhibe una actividad amilolítica residual y con ello estabilidad al almacenamiento mejoradas, en comparación con los agentes de lavado de las cargas 1 y 2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF SE

<120> Agente de lavado o detergente líquido estable al almacenamiento que contiene proteasa y amilasa

<130> 0000075512EP02

<150> DE 102010063458.1
<151> 17-12-2010

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 269
<212> PRT
<213> *Bacillus lentus*

<400> 1

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

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
<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
```

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

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

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

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

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

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
    210                 215                 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225                 230                 235                 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
                245                 250                 255

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

<210> 3
<211> 269
<212> PRT
<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

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
<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

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
<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

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
<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
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
<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

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

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

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
    210                 215                 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225                 230                 235                 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
                245                 250                 255

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

<210> 8
<211> 269
<212> PRT
<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

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. Agente de lavado o detergente líquido que comprenden

(a) una proteasa, 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 según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido ácido asparagínico (D),
y
(b) una amilasa.

2. Agente de lavado o detergente según la reivindicación 1, **caracterizados porque** la proteasa exhibe además en la numeración según 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),
(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).

3. Agente de lavado o detergente líquido que comprenden

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

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 3;
b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 3, en donde la modificación de la numeración según SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. treonina en la posición 3 (3T),
ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 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),
viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211E o 211G),
ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

(b) una amilasa.

4. Agente de lavado o detergente según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizados porque** la amilasa está presente en una cantidad del 1 x 10^{-8} al 5 por ciento en peso, referido a la proteína activa, y/o porque la proteasa está presente en una cantidad del 1 x 10^{-8} al 5 por ciento en peso, referida a la proteína activa.

5. Agente de lavado o detergente según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizados porque** comprenden además un componente que es elegido de entre

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

6. Agente de lavado o detergente según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizados porque** comprenden por lo menos otro ingrediente, en particular uno que es elegido de entre el grupo consistente en fosfonato, surfactante, material estructural (relleno), solvente no acuoso, ácido, sal soluble en agua, agente espesante así como sus combinaciones.

7. Agente de lavado o detergente según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizados porque** comprenden por lo menos otra enzima, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, ß-glucosidasa, pectinasa, carrageninasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa, así como sus mezclas.

8. Uso de un agente de lavado o un detergente según una de las reivindicaciones 1 a 7 para la eliminación de

ensuciamientos sensibles a proteasas sobre textiles o superficies duras.

9. Procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras, caracterizado por que en por lo menos una etapa del método se usa un agente de lavado o un detergente según una de las reivindicaciones 1 a 7.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado por que** la amilasa en el licor de lavado está presente en una concentración de 0,0000003 a 0,0004 % en peso, y/o por que la proteasa en el licor de lavado está presente en una concentración de 0,00009 a 0,0005 % en peso.

11. Procedimiento según las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado por que** se lleva a cabo a una temperatura de entre 10 °C y 50 °C, preferiblemente de entre 10 °C y 40 °C y preferido de modo particular de entre 20 °C y 40 °C.

12. Uso de una proteasa,
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 según SEQ ID NO. 1 exhibe el aminoácido ácido asparagínico (D),
para proporcionar una actividad proteolítica en un agente de lavado o un detergente líquido, que comprenden una amilasa.

13. Uso según la reivindicación 12, **caracterizado por que** la proteasa exhibe además en la numeración según 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),
(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).

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

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 3;
b. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en por lo menos una posición respecto a SEQ ID NO. 3, en donde la modificación de la numeración según SEQ ID NO. 1 es elegida de entre el grupo consistente en:

i. treonina en la posición 3 (3T),
ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 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),
viii. ácido asparagínico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211D, 211E o 211G),
ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

para proporcionar una actividad proteolítica en un agente de lavado o un detergente líquido, que comprenden una amilasa.