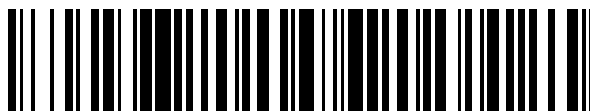


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 882**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2011** **E 11717659 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015** **EP 2569409**

54 Título: **Detergente o agente o de limpieza líquido, estable en almacenamiento y que contiene proteasa y lipasa**

30 Prioridad:

12.05.2010 DE 102010028951

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

16.02.2016

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 559 882 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detergente o agente o de limpieza líquido, estable en almacenamiento y que contiene proteasa y lipasa

La invención se basa en el campo de los agentes de lavado y de limpieza líquidos. La invención se refiere en particular a agentes de lavado y de limpieza líquidos que contienen enzima, que contienen proteasas definidas en combinación con una lipasa, y propone así mismo procedimientos en los que se emplean agentes de este tipo. La invención se refiere así mismo a usos de proteasas definidas en agente de lavado o de limpieza líquidos que contienen una lipasa.

Para los agentes de lavado y de limpieza se utilizan preferentemente proteasas del tipo subtilisina. Las proteasas utilizadas en los agentes de lavado o de limpieza conocidos por el estado de la técnica proceden o bien originalmente de microorganismos, por ejemplo de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, o *Pseudomonas*, y/o se producen de acuerdo con procedimientos biotecnológicos conocidos mediante microorganismos adecuados, por ejemplo mediante huéspedes de expresión transgénicos de los géneros *Bacillus* o mediante hongos filamentosos.

En particular, en los agentes de lavado líquidos modernos, están contenidas cada vez más enzimas adicionales, entre ellas, en particular, lipasas. Una lipasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de compuestos de éster en sustratos de lípido, en particular en grasas y aceites. Las lipasas representan por lo tanto un grupo de las esterasas. Las lipasas son en general enzimas versátiles, que aceptan una pluralidad de sustratos, por ejemplo ésteres alifáticos, alicíclicos, bicíclicos y aromáticos, tioésteres y aminas activadas. Las lipasas actúan contra los residuos de grasa en la colada, catalizando su hidrólisis (lipólisis). Las lipasas con amplios espectros de sustrato se usan en particular allí donde deben convertirse materias primas o mezclas de sustrato no homogéneas, es decir, por ejemplo en agentes de lavado y de limpieza, dado que los ensuciamientos pueden componerse de grasas y aceites de diferente composición.

En la solicitud de patente internacional WO 95/23221 se divulgan proteasas o variantes de proteasa del tipo subtilisina de *Bacillus lentus* DSM 5483, que son adecuadas para el uso en agentes de lavado o de limpieza. Entre estas proteasas se encuentra también una que puede presentar un cambio de aminoácido R99E, A, S o G. Así mismo se divulga que los agentes de lavado pueden contener enzimas adicionales, entre ellas también una lipasa. Los agentes de lavado pueden ser sólidos o líquidos. Sin embargo, a partir de este documento, no se deduce directamente y de forma inequívoca un agente de lavado líquido, que contiene una lipasa en combinación con una proteasa, que presenta en la posición 99 el aminoácido ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) o el aminoácido asparagina (N) o glutamina (Q) o el aminoácido alanina (A) o glicina (G) o serina (S). Lo mismo es válido para la solicitud de patente europea EP 1921147.

Una desventaja de agentes de lavado y de limpieza líquidos que contienen proteasa y lipasa del estado de la técnica es que no son suficientemente estables en almacenamiento y que, por lo tanto, ya después de un corto tiempo, pierden una cantidad considerable de actividad lipolítica y/o proteolítica, en particular de actividad lipolítica. Con frecuencia, la presencia de proteasa lleva a la pérdida de actividad lipolítica, dado que la proteasa inactiva la lipasa. El agente de lavado o de limpieza ya no muestra entonces un poder de limpieza óptimo.

La presente invención se basa en el objetivo de vencer la desventaja mencionada y proporcionar agentes de lavado o de limpieza líquidos que contienen proteasa y lipasa, que son, suficientemente o de manera mejorada, estables en almacenamiento, en particular con respecto a su actividad lipolítica.

Un objeto de la invención es por lo tanto un agente de lavado o de limpieza líquido que comprende

- (a) una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 en al menos el 80 % y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta el aminoácido ácido glutámico (E), y
- (b) una lipasa.

Sorprendentemente se determinó que un agente de lavado o de limpieza líquido, que contiene la combinación de una proteasa de este tipo con una lipasa, es ventajosamente estable en almacenamiento. En particular, presenta una mayor actividad lipolítica tras almacenamiento en comparación con un agente de lavado o de limpieza, que se diferencia de un agente de acuerdo con la invención únicamente en la proteasa presente en el agente respectivo, estando presente en los agentes que van a compararse la proteasa al comienzo del almacenamiento en igual concentración, con respecto a enzima activa. Una proteasa prevista en el contexto de la presente invención lleva por lo tanto a una inactivación reducida de la lipasa. La inactivación reducida de lipasa mediante la proteasa prevista en el contexto de la presente invención no se basa, sin embargo, en una actividad proteasa insuficiente.

Un agente de acuerdo con la invención presenta, a este respecto y preferentemente un poder de limpieza además bueno, en particular ventajoso, sobre ensuciamientos sensibles a proteasa. Un poder de limpieza de este tipo con respecto a al menos un ensuciamiento sensible a proteasa aparece en particular también a bajas temperaturas, por ejemplo entre 10 °C y 50 °C, preferentemente entre 10 °C y 40 °C o entre 20 °C y 40 °C. Un agente de este tipo permite, por lo tanto, una eliminación satisfactoria o mejorada de al menos uno, preferentemente de varios

ensuciamientos sensibles a proteasa sobre materiales textiles y/o superficies duras, por ejemplo la vajilla.

Con respecto a la solicitud de patente internacional WO 95/23221 mencionada al principio, se trata en el caso de la presente invención por lo tanto de una elección especialmente ventajosa que lleva a la obtención de un agente de lavado líquido potente y estable en almacenamiento, en particular con respecto a la actividad proteolítica y/o lipolítica del agente o la actividad residual del agente tras almacenamiento.

Por poder de limpieza se entiende en el contexto de la invención el poder de aclaramiento sobre uno o varios ensuciamientos, en particular ensuciamientos de ropa. Ejemplos de tales ensuciamientos son sangre-leche/tinta china sobre algodón, huevo/pigmento sobre algodón, chocolate-leche/tinta china sobre algodón, aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón, hierba sobre algodón o cacao sobre algodón, en particular tal como se indica a continuación. En el contexto de la invención, tanto el agente de lavado o de limpieza, que comprende la proteasa y la lipasa o las aguas de lavado o de limpieza formadas por este agente, como la proteasa o la lipasa en sí, presenta un poder de limpieza respectivo. El poder de limpieza de las enzimas contribuye por lo tanto al poder de limpieza del agente o de las aguas de lavado o de limpieza formadas por el agente. El poder de limpieza se determina preferentemente tal como se indica más adelante.

Por aguas de lavado o de limpieza se entiende aquella solución de uso que contiene el agente de lavado o de limpieza, que actúa sobre materiales textiles o tejido (aguas de lavado) o superficies duras (aguas de limpieza) y, por lo tanto, entra en contacto con los ensuciamientos presentes sobre materiales textiles o tejidos o superficies duras. Habitualmente las aguas de lavado o de limpieza se generan cuando comienza el proceso de lavado o de limpieza y el agente de lavado o de limpieza se diluye con agua por ejemplo en una lavadora o en otro recipiente adecuado.

Una estabilidad en almacenamiento en el sentido de la invención existe cuando un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención tras un almacenamiento presenta una mayor actividad lipasa en comparación con una composición control, que se diferencia sólo en la proteasa contenida en la composición control del agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención. Tras el almacenamiento, un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención presenta por lo tanto una mayor actividad residual de la lipasa en comparación con el control. Ambos agentes que van a compararse presentan, al comiendo del almacenamiento, por lo tanto la misma cantidad o concentración de lipasa y/o actividad inicial lipolítica. Además, en ambos agentes la proteasa está presente al comienzo del almacenamiento en igual concentración, con respecto a enzima activa, y ambos agentes se tratan de la misma manera, en particular en lo referente a las condiciones del almacenamiento y la determinación de la actividad enzimática. Más preferentemente el almacenamiento tiene lugar durante al menos 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. Más preferentemente el almacenamiento tiene lugar a una temperatura de 20 °C, 25 °C o 30 °C, de manera especialmente preferente a 30 °C.

La actividad enzimática puede tener lugar, a este respecto, de manera adaptada al tipo de enzima respectivo, de manera habitual en la práctica profesional. Los métodos para la determinación de la actividad son conocidos por el experto en el campo de la tecnología de las enzimas y se emplean por este de manera rutinaria. Procedimientos para la determinación de la actividad proteasa se divulgan por ejemplo en tensioactivos, volumen 7 (1970), página 125-132. La actividad proteolítica puede determinarse así mismo a través de la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) a partir del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). La proteasa escinde el sustrato y libera pNA. La liberación de la pNA provoca un aumento de la extinción a 410 nm, cuya evolución temporal es una medida para la actividad enzimática (véase Del Mar et al., 1979). La medición tiene lugar a una temperatura de 25 °C, a pH 8,6 y a una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición asciende a 5 min con un intervalo de medición de 20 s a 60 s. La actividad proteasa se indica preferentemente en PE (unidades de proteasa).

La actividad lipasa se determina de manera habitual en la práctica profesional, en concreto, preferentemente tal como se describe en Bruno Stellmach, "Bestimmungsmethoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin" (Steinkopff Verlag Darmstadt, 1988, página 172 y siguientes). En este sentido se añaden muestras que contienen lipasa a una emulsión de aceite de oliva en agua que contiene emulsionante y se incuban a 30 °C y pH 9,0. A este respecto se liberan ácidos grasos. Estos se valoran con un autotitulado durante 20 min de manera continua con hidróxido de sodio 0,01 N, de modo que el valor de pH se mantiene constante ("pH-stat-Titration"). Mediante el consumo de hidróxido de sodio tiene lugar por medio de referencia a una muestra de lipasa de referencia la determinación de la actividad lipasa.

La concentración de proteína puede determinarse con ayuda de métodos conocidos, por ejemplo el procedimiento de BCA (ácido bicinónico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), página 751-766). La determinación de la concentración de proteína activa puede tener lugar a través de una valoración de los centros activos con el uso de 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), página 5890-5913). El contenido en proteína activa de una preparación de lipasa puede determinarse a este respecto mediante valoración de "sitio activo" de la preparación de lipasa por medio de p-nitrofenil-n-hexilfosfonato de metilo como inhibidor. En este sentido distintas concentraciones de la enzima en un sistema tampón correspondiente se dotan con un exceso de inhibidor y se determina la cantidad que va a liberarse de p-nitrofenolato por medio de espectrofotometría a 400 nm

de longitud de onda (véase a este respecto también Rotticci et al.; "An active-site titration method for lipases"; Biochim. Biophys. Acta 1483(1), página 132-140). En el contexto de la presente invención se prefieren los métodos de determinación anteriores.

De manera especialmente preferente se determina la presencia de una estabilización de enzima en el sentido de la presente invención tal como se indicó anteriormente con el uso de un agente de lavado o de limpieza líquido que contiene proteasa y lipasa, que se almacena durante cuatro semanas a una temperatura de 30 °C, determinándose la actividad proteolítica a través de la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) a partir del sustrato suc-AAPF-pNA, y la actividad lipolítica se determina tal como se indicó anteriormente.

La proteasa contenida en un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 en al menos el 80 % y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta el aminoácido ácido glutámico (E). Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos el 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y de manera muy especialmente preferente es idéntica en el 99 % a la secuencias de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1. SEQ ID NO. 1 es la secuencia de la proteasa alcalina formada (madura) de *Bacillus lentus* DSM 5483, que se divulga en la solicitud de patente internacional WO 92/21760, y a cuya divulgación se hace referencia expresamente en el presente documento.

De acuerdo con la invención se ha mostrado que mediante la adición de una proteasa de este tipo a un agente de lavado o de limpieza líquido, que contiene una lipasa, se obtiene un agente de lavado líquido especialmente estable en almacenamiento, en particular con respecto a su actividad lipolítica restante tras almacenamiento, en particular tras una duración de almacenamiento de 1 a 8 semanas, de 1 a 6 semanas, de 1,5 a 5 semanas y de manera especialmente preferente después de 4 semanas.

Una proteasa contenida en un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención presenta una actividad proteolítica, es decir, puede realizar la hidrólisis de enlaces peptídicos de un polipéptido o de una proteína. Es por lo tanto una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos y de esta manera puede escindir péptidos o proteínas. Es en particular una subtilasa y de manera especialmente preferente una subtilisina.

Lipasas que pueden confeccionarse de acuerdo con la invención son por ejemplo las que pueden obtenerse originalmente a partir de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*), o lipasas más evolucionadas, en particular aquellas con el cambio de aminoácido D96L. Se comercializan por ejemplo por la empresa Novozymes con los nombres comerciales Lipolase®, Lipolase®Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® y Lipex®. Una lipasa utilizable adicional puede obtenerse por la empresa Novozymes con el nombre comercial Lipoclean®. Además, pueden utilizarse por ejemplo las cutinasas, que se han aislado originalmente a partir de *Fusarium solani* pisi y *Humicola insolens*. Lipasas que pueden usarse pueden obtenerse de la empresa Amano con las denominaciones Lipase CE®, Lipase P®, por ejemplo Lipase PS®, Lipase B®, o Lipase CES®, Lipase AKG®, *Bacillus* sp. Lipase®, Lipase AP®, Lipase M-AP® y Lipase AML®. De la empresa Genencor pueden utilizarse por ejemplo las lipasas o cutinasas, cuyas enzimas de partida se han aislado originalmente de *Pseudomonas mendocina* y *Fusarium solanii*. Como productos comerciales importantes adicionales han de mencionarse las preparaciones comercializadas originalmente por la empresa Gist-Brocades M1 Lipase® y Lipomax® y las enzimas comercializadas por la empresa Meito Sangyo KK, Japón, con los nombres Lipase MY-30®, Lipase OF® y Lipase PL®, así mismo el producto Lumafast® de la empresa Genencor. Lipasas especialmente preferentes se divulgan en las publicaciones para información de solicitud de patente internacional WO 92/05249, WO 00/60063, WO 2007/087508 y WO 2007/087503, a cuya divulgación se remite por lo tanto expresamente.

En una forma de realización adicional de la invención, el agente de lavado o de limpieza se caracteriza porque la proteasa así mismo en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta al 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 aspártico 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 aspártico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
- (i) combinaciones de los aminoácidos (a) a (h).

Además del aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 99, la proteasa presenta por lo tanto uno o varios de los aminoácidos mencionados anteriormente en las posiciones respectivas. Estos aminoácidos pueden provocar propiedades ventajosas adicionales y/o reforzar aún más propiedades ya presentes. En particular, los aminoácidos mencionados anteriormente provocan un aumento de la actividad proteolítica y/o de la estabilidad de la proteasa en un agente de lavado o de limpieza líquido o en las aguas de lavado formadas mediante este agente de lavado o de

limpieza. Mediante la adición de una proteasa de este tipo a un agente de lavado o de limpieza líquido, que contiene una lipasa, se obtiene por lo tanto así mismo un agente de lavado líquido especialmente estable en almacenamiento, en particular con respecto a su actividad lipolítica restante tras almacenamiento, pero preferentemente también con respecto a su actividad proteolítica restante tras almacenamiento, en particular tras una duración de almacenamiento de 1 a 8 semanas, de 1 a 6 semanas, de 1,5 a 5 semanas y de manera especialmente preferente después de 4 semanas. Así mismo, un agente de este tipo muestra poderes de limpieza mejorados en ensuciamientos sensibles a proteasa y/o lipasa.

Las posiciones de aminoácido se definen en este sentido mediante una alineación de la secuencia de aminoácidos de la proteasa que va a utilizarse con la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus*, tal como está indicado en la SEQ ID NO. 1. Dado que la proteasa de *Bacillus lentus* en el estado de la técnica representa una molécula de referencia importante para la descripción de proteasas y de modificaciones de aminoácido es ventajoso hacer referencia en la asignación de las posiciones de aminoácido a la enumeración de la proteasa de *Bacillus lentus* (SEQ ID NO. 1). Además la enumeración depende de la proteína formada (madura). Esta asignación puede emplearse en particular también cuando la secuencia de aminoácidos de la proteasa que va a utilizarse comprende un mayor número de restos aminoácido que la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con la SEQ ID NO. 1. Partiendo de las posiciones mencionadas en la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus* las posiciones de aminoácido en una proteasa que va a utilizarse de acuerdo con la invención son aquellas que están asociadas justo a estas posiciones en una alineación.

Posiciones especialmente ventajosas además de la posición 99 son por consiguiente las posiciones 3, 4, 61, 154, 188, 193, 199 y 211, asociadas en una alineación con la SEQ ID NO. 1 y por lo tanto en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1. En las posiciones mencionadas, en la molécula de tipo natural de la proteasa de *Bacillus lentus* se encuentran los siguientes restos aminoácido: S3, V4, G61, S154, A188, V193, V199 y L211. Se prefieren especialmente los aminoácidos 3T, 4I, 61A, 154D, 154E, 211D, 211G y 211 E, siempre que las posiciones correspondientes en una proteasa que va a utilizarse de acuerdo con la invención no se hayan equipado ya por uno de estos aminoácidos preferidos. El cambio de 3T y 4I llevan por ejemplo a través de un efecto de estabilización sobre la molécula a una mejora de la estabilidad en almacenamiento y del poder de limpieza de la proteasa y con ello a un poder de limpieza mejorado de un agente de lavado o de limpieza líquido de acuerdo con la invención, que contiene la proteasa.

Si se realiza uno o varios de los aminoácidos mencionados anteriormente en la posición respectiva, resultan además de la posición 99, desviaciones de secuencia adicionales de SEQ ID NO. 1, dado que SEQ ID NO. 1 presenta otro aminoácido en la posición respectiva. En función del número de desviaciones de secuencia presentes de SEQ ID NO.1 resultan por lo tanto diferentes valores de identidad máximos, que puede presentar una proteasa que va a utilizarse de acuerdo con la invención con respecto a la SEQ ID NO. 1, incluso cuando coincidiera en todos los aminoácidos restantes con la SEQ ID NO. 1. Esta circunstancia ha de tenerse en cuenta para cualquier combinación posible de los aminoácidos propuestos en el caso individual y depende así mismo también de la longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteasa. Por ejemplo, la identidad máxima en el caso de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve modificaciones de secuencia asciende al 99,63 %, 99,26 %, 98,88 %, 98,51 %, 98,14 %, 97,77 %, 97,40 %, 97,03 % o 96,65 % en el caso de una secuencia de aminoácidos de 269 aminoácidos de longitud, o el 99,64 %, 99,27 %, 98,91 %, 98,55 %, 98,18 %, 97,82 %, 97,45 %, 97,09 % o 96,73 % en el caso de una secuencia de aminoácidos de 275 aminoácidos de longitud.

La determinación de la identidad de secuencias de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos tiene lugar mediante una comparación de secuencias. Una comparación de este tipo tiene lugar porque se asocian sucesiones similares en las secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos entre sí. Esta comparación de secuencias tiene lugar preferentemente basándose en el algoritmo BLAST establecido en el estado de la técnica y usado habitualmente (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, páginas 3389-3402) y sucede, en principio, porque se asocian sucesiones similares de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos entre sí. Una asociación de tabla de las posiciones en cuestión se denomina alineación. Un algoritmo adicional disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA. Comparaciones de secuencias (alineaciones), en particular comparaciones de secuencias múltiples, se producen habitualmente con programas informáticos. Con frecuencia se usan por ejemplo la serie Clustal (véase por ejemplo Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (véase por ejemplo Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas que se basan en estos programas o algoritmos. En el contexto de la presente invención se producen comparaciones de secuencias y alineaciones preferentemente con el programa informático Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EE.UU.) con los parámetros estándar (por defecto) predeterminados.

Una comparación de este tipo permite una declaración sobre la similitud de las secuencias comparadas entre sí. Se indica habitualmente en porcentaje de identidad, es decir, el porcentaje de los nucleótidos o restos de aminoácido idénticos en las mismas posiciones o posiciones correspondientes entre sí en una alineación. El término abarcado

adicionalmente de la homología se refiere en el caso de secuencias de aminoácidos a cambios de aminoácido conservados en la contemplación, es decir, aminoácidos con propiedades similares, dado que estos ejercen dentro de la proteína en la mayoría de los casos actividades o funciones similares. Por lo tanto, la similitud de las secuencias comparables puede estar indicada también en porcentaje de homología o porcentaje de similitud. Los datos de identidad y/u homología pueden afectar a lo largo del polipéptido completo o gen o sólo a lo largo de regiones individuales. Homólogos o regiones idénticas de distintas secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos se definen por lo tanto mediante coincidencias en las secuencias. Presentan con frecuencia funciones iguales o similares. Pueden ser pequeños y comprender sólo algunos nucleótidos o aminoácidos. Con frecuencia, tales regiones pequeñas ejercen funciones esenciales para la actividad total de la proteína. Puede ser útil por lo tanto referir coincidencias de secuencia sólo a regiones individuales, opcionalmente pequeñas. Siempre que no se indique lo contrario, los datos de identidad o de homología en la presente solicitud se refieren en cambio a la longitud total de la secuencia de ácido nucleico o de aminoácido indicada en cada caso.

En una forma de realización adicional de este objeto de la invención, el agente de lavado o de limpieza se caracteriza porque la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 tal como se indicó anteriormente y que se obtiene o puede obtenerse a partir de una proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 mediante una sustitución de aminoácidos conservativa simple o múltiple, presentando la proteasa en la posición 99 aún el aminoácido ácido glutámico (E) tal como se describió anteriormente. La expresión "sustitución de aminoácidos conservativa" significa el cambio (sustitución) de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido, no llevando este cambio a una modificación de la polaridad o la carga en la posición del aminoácido cambiado, por ejemplo el cambio de un resto de aminoácido no polar por otro resto de aminoácido no polar. Las sustituciones de aminoácidos conservativas en el contexto de la invención comprenden por ejemplo: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

En una forma de realización adicional de la invención, un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención se caracteriza así mismo porque su poder de limpieza corresponde al menos al de un agente de lavado o de limpiezas que incluye una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 2. El poder de limpieza se determina en un sistema de lavado, que contiene un agente de lavado que contiene lipasa en una dosificación entre 2,0 y 9,0 gramos por litro de agua de lavado así como la proteasa, utilizándose las proteasas que van a compararse en igual concentración (con respecto a proteína activa) y el poder de limpieza frente a uno o varios de los ensuciamientos sangre-leche/tinta china sobre algodón, huevo/pigmento (huevo entero/hollín) sobre algodón, aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón y hierba sobre algodón, en particular frente a uno o varios de los ensuciamientos

- sangre-leche/tinta china sobre algodón: producto n.º C-05 que puede obtenerse de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos
- huevo/pigmento (huevo entero/hollín) sobre algodón: producto n.º 10N que puede obtenerse de la empresa wfk Testgewebe GmbH; Brügggen-Bracht, Alemania, o producto C-S-37 que puede obtenerse de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos
- aceite de cacahuete-pigmento/tinta china sobre poliéster/algodón: producto n.º PC-10 que puede obtenerse de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos
- hierba sobre algodón: producto n.º 164 que puede obtenerse de la empresa Eidgenössische Material- y Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza,

se determina mediante medición del grado de blancura de los materiales textiles lavados, el proceso de lavado tiene lugar durante al menos 30 minutos, opcionalmente 60 minutos, a una temperatura de 20 °C y el agua presenta una dureza del agua 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 tal como sigue (todos los datos en por ciento en peso): 0,3-0,5 % de goma xantana, 0,2-0,4 % de antiespumante, 6-7 % de glicerol, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (éter sulfato de alcohol graso), 24-28 % de tensioactivos no iónicos, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato de sodio (dihidratado), 2-4 % de sosa, 14-16 % de ácidos grasos de coco, 0,5 % de HEDP (ácido 1-hidroxietano-(1,1-di-fosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de blanqueante óptico, 0-0,001 % de colorante, 0,0001-0,06 % de lipasa (proteína activa), preferentemente 0,01-3 % de Lipex 100L (preparación de lipasa de la empresa Novozymes, contenido en sustancia activa 1,9 %), el resto agua desmineralizada. La proteasa se utiliza en el agente de lavado en una concentración del 0,001-0,1 %, preferentemente del 0,01 al 0,06 %, con respecto a proteína activa. La dosificación del agente de lavado líquidos asciende a entre 2,0 y 9,0, preferentemente entre 3,0 y 8,2, entre 4,0 y 7,5 y de manera especialmente preferente 4,7 gramos por litro de agua de lavado. Se lava en un intervalo de valor de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferentemente entre pH 8 y pH 9. Ni la actividad proteasa ni la actividad lipasa en las aguas de lavado son igual a cero al comienzo del lavado.

El grado de blancura, es decir el aclaramiento de los ensuciamientos, como medida del poder de limpieza se determina con procedimientos de medición ópticos, preferentemente de manera fotométrica. Un aparato adecuado para ello es por ejemplo es espectrómetro Minolta CM508d. Habitualmente, los aparatos utilizados para la medición se calibran previamente con un patrón blanco, preferentemente un patrón blanco gelificado conjuntamente.

En una forma de realización adicional de la invención, un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención se caracteriza así mismo porque su estabilidad en almacenamiento corresponde al menos a la de un agente de lavado o de limpieza, que incluye una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos, que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 2. Una estabilidad en almacenamiento de este tipo existe cuando el agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención tras un almacenamiento de 4 semanas a 30 °C presenta una actividad lipasa igual o mayor que el agente de lavado o de limpieza al que se recurre para la comparación, diferenciándose el agente de acuerdo con la invención sólo mediante la proteasa contenida del agente de lavado o de limpieza al que se recurre para la comparación.

De manera especialmente preferente, en el caso de los agentes a los que se recurre para la comparación, se trata de un agente de lavado líquido que se compone tal como sigue (todos los datos en por ciento en peso): 0,3-0,5 % de goma xantana, 0,2-0,4 % de antiespumante, 6-7 % de glicerol, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (éter sulfato de alcohol graso), 24-28 % de tensioactivos no iónicos, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato de sodio (dihidratado), 2-4 % de sosa, 14-16 % de ácidos grasos de coco, 0,5 % de HEDP (ácido 1-hidroxietano-(1,1-difosfónico)), 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de blanqueante óptico, 0-0,001 % de colorante, 0,0001-0,06 % de lipasa (proteína activa), preferentemente 0,01-3 % de Lipex 100L (preparación de lipasa de la empresa Novozymes, contenido en sustancia activa 1,9 %), el resto agua desmineralizada. La proteasa se utiliza en el agente de lavado en una concentración del 0,001-0,1 %, preferentemente del 0,01 al 0,06 %, con respecto a proteína activa.

Al comienzo del almacenamiento ambos agentes que van a compararse presentan la misma actividad lipolítica inicial, contienen la proteasa en igual concentración con respecto a enzima activa, y ambos agentes se tratan de igual manera. La actividad proteolítica en los agentes se determina en cada caso a través de la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) a partir del sustrato suc-AAPF-pNA, y su actividad lipolítica se determina en cada caso tal como se indicó anteriormente. Las actividades iniciales para la proteasa y la lipasa en el agente respectivo no son igual a cero.

Mediante el uso de igual actividad respectivo de la lipasa y el uso de igual concentración de las proteasas, con respecto a proteína activa, se garantiza que también en el caso de una posible separación de la relación de sustancia activa con respecto a proteína total (los valores de la actividad específica) se comparan las propiedades enzimáticas existentes en realidad.

Siempre que no se indique lo contrario, en el contexto de la presente invención se hace referencia en cada caso al peso del agente de lavado líquido, es decir los datos son con respecto a su peso.

Numerosas proteasas y en particular las subtilisinas se forman como las denominadas preproteínas, es decir, junto con un propéptido y un péptido señal, consistiendo la función del péptido señal habitualmente en garantizar la exclusión de la proteasa de la célula que la produce al periplasma o el medio que rodea la célula, y el propéptido es necesario habitualmente para el plegamiento correcto de la proteasa. El péptido señal y el propéptido son, por regla general, la parte N-terminal de la preproteína. El péptido señal se escinde en condiciones naturales mediante una peptidasa señal de la proteasa restante. A continuación tiene lugar el plegamiento definitivo correcto de la proteasa soportado por el propéptido. La proteasa está entonces en su forma activa y escinde el propéptido en sí. Después de la escisión del propéptido, entonces la proteasa formada (madura), en particular subtilisina, ejerce su actividad catalítica sin los aminoácidos N-terminales originalmente presentes. Para las aplicaciones técnicas en general y en particular en el contexto de la invención se prefieren las proteasas formadas (maduras), es decir las enzimas procesadas después de su producción, frente a las preproteínas. Las proteasas pueden modificarse así mismo por las células que las producen después de la producción de la cadena polipeptídica, por ejemplo mediante unión de moléculas de azúcar, formilaciones, aminaciones, etc. Tales modificaciones son modificaciones postraduccionales y pueden, pero sin embargo no deben, ejercer una influencia sobre la función de la proteasa.

Así mismo también la proteasa formada puede estar unida en su extremos N-terminal y/o C-terminal, de modo que una proteasa acortada con respecto a la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2, es decir, un fragmento, está contenida en el agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención. Todos los datos de identidad se refieren en este caso a aquella región en la que está asociado el fragmento respectivo en una alineación de SEQ ID NO. 1. El fragmento respectivo incluye en cambio en cualquier caso aquella posición que está asociada a la posición 99 en una alineación con la SEQ ID NO. 1, y presenta en esta posición un aminoácido correspondiente. De manera ventajosa, incluye también una o varias de las posiciones descritas anteriormente adicionales y presenta allí un aminoácido correspondiente. Así mismo un fragmento de este tipo tiene actividad proteolítica. Un fragmento adicionalmente preferido a este respecto comprende una secuencia de aminoácidos que, a lo largo de una longitud de al menos 50 o al 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 aminoácido relacionadas, coincide con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2, teniendo en cuenta los aminoácidos mencionados anteriormente para la posición 99 y opcionalmente así mismo para las posiciones 3 y/o 4 y/o 61 y/o 154 y/o 188 y/o 193 y/o 199 y/o 211. De manera especialmente preferente, el poder de limpieza y/o la estabilidad en almacenamiento de un agente de lavado o de limpieza líquido de acuerdo con la invención con un fragmento de este tipo corresponde al menos al de un agente de lavado o de limpieza, que incluye una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos, que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 2, en cada caso determinada tal como se indicó anteriormente.

Otro objeto de la invención es un agente de lavado o de limpieza líquido que comprende

(a) una proteasa, que se selecciona del grupo que consiste en

a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 2;
b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en al menos una posición con respecto a la SEQ ID NO. 2, seleccionándose la modificación en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 del 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 61 R),
- iv. ácido aspártico 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 aspártico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
- ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

(b) una lipasa.

Estas proteasas se utilizan de manera muy especialmente preferente en un agente de lavado o de limpieza líquido de acuerdo con la invención. Se obtienen a partir de SEQ ID NO. 1 mediante la sustitución del aminoácido arginina en la posición 99 por el aminoácido ácido glutámico (E) en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1. Esta secuencia de aminoácidos está indicada en el protocolo de secuencias como SEQ ID NO. 2. Así mismo, estas proteasas pueden presentar además del aminoácido previsto para la posición 99, uno o varios de los aminoácidos explicados anteriormente en las posiciones 3, 4, 61, 154, 188, 193, 199 y 211, asociarse en una alineación con la SEQ ID NO. 1 y con ello en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1. Los aminoácidos mencionados para estas posiciones provocan también en estas proteasas propiedades ventajosas adicionales y/o refuerzan aún más propiedades ya presentes. En particular provocan un aumento de la actividad proteolítica y/o de la estabilidad de la proteasa en un agente de lavado o de limpieza líquido o en las aguas de lavado formadas por este agente de lavado o de limpieza. Todas las realizaciones anteriores, siempre que puedan aplicarse, son válidas de manera correspondiente para estas proteasas especialmente preferidas.

Los agentes de acuerdo con la invención contienen la proteasa y la lipasa en cada caso en una cantidad total de 1×10^{-8} a 5 por ciento en peso con respecto a proteína activa. Preferentemente, cada enzima está contenida del 0,0001-1 % y más preferentemente del 0,0005-0,5 %, del 0,001 al 0,1 % y de manera especialmente preferente del 0,001 al 0,06 % en peso, en los agentes de acuerdo con la invención, con respecto a proteína activa.

La proteasa y/o la lipasa pueden estar adsorbidas así mismo en sustancias portadoras y/o incrustadas en sustancias de envuelta, para protegerlas contra una inactivación prematura. En las aguas de lavado, es decir, en las condiciones de aplicación, se libera entonces la enzima y puede mostrar su acción catalítica.

En una forma de realización adicional de la invención, el agente de lavado o de limpieza se caracteriza porque comprende así mismo un componente, que se selecciona de

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

Se estableció que la adición de tales sustancias mejora adicionalmente el poder de limpieza de agentes de lavado y de limpieza, en particular de agentes de lavado o de limpieza líquidos, que contienen proteasas y lipasas, en particular aquellos tal como se describieron 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 utilizarse de acuerdo con la invención aparece una acción sinérgica, sobre todo con respecto a la eliminación de al menos un ensuciamiento sensible a proteasa, en particular uno del tipo tal como se indicó anteriormente.

En el caso de las sustancias indicadas anteriormente en i., se trata de sustancias aniónicas o polianiónicas, es decir estas sustancias portan al menos una y preferentemente varias cargas negativas. Preferentemente se trata de un polímero con al menos un monómero cargado negativamente, preferentemente con varios monómeros cargados negativamente. De acuerdo con la invención preferentemente este polímero es por lo tanto un polímero cargado negativamente. Se prefieren por ejemplo polímeros de ácidos orgánicos o sus sales, en particular poliácridatos y/o poli(ácidos de azúcar) y/o copolímeros de poliácridato y/o copolímeros de poli-azúcar. A este respecto, son compuestos preferidos adicionales poliácridsulfonatos o policarboxilatos y sus sales, copolímeros o sales de los copolímeros.

Ejemplos de sustancias que van a utilizarse especialmente preferidas son Acusol 587D (poliacrilsulfonato; empresa Rohm & Haas/Dow Chemical), Acusol 445N (sal sódica de policarboxilato; empresa Rohm & Haas/Dow Chemical), Acusol 590 (copolímero de poliacrilato; empresa Rohm & Haas/Dow Chemical), Acusol 916 (sal sódica de poliacrilato; empresa Rohm & Haas/Dow Chemical), Sokalan CP42 (sal sódica de policarboxilato modificado; empresa BASF), Sokalan PA 30CL (sal sódica de policarboxilato; empresa BASF), Dequest P 9000 (poli(ácido maleico); empresa Thermphos), ácido alginico, poli(ácido-2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico), sal sódica de poli(ácido-4-estirenosulfónico)-co-ácido maleico, sal sódica de poli(ácido-acrilamido-co-acrílico), poli-(ácido metacrílico), poli-metilo vinil éter-alt ácido maleico o sal sódica de poli(ácido vinilsulfónico).

En el caso de las sustancias indicadas en ii. se trata de sustancias catiónicas o policationicas, es decir estas sustancias portan al menos una y preferentemente varias cargas positivas. Preferentemente se trata de un polímero con al menos un monómero cargado positivamente, preferentemente con varios monómeros cargados positivamente. De acuerdo con la invención, preferentemente este polímero es por lo tanto un polímero cargado positivamente. Ejemplos de compuestos preferidos a este respecto son sales de las poliaminas, polietileniminas o sus copolímeros, sales de las polialilaminas, sales de los compuestos de polidialildimetilamonio o compuestos de poli(acrilamida-co-dialildimetilamonio).

En el caso de las sustancias indicadas en iii. se trata de sustancias que presentan al menos un grupo hidroxilo y/o polihidroxilo y preferentemente varios grupos hidroxilo y/o polihidroxilo. Se prefieren a este respecto por ejemplo poli(alcoholes vinílicos), por ejemplo aquellos que se encuentran disponibles con el nombre comercial Mowiol (empresa Kremer Pigmente GmbH & Co. KG).

Se indica en este punto expresamente que una sustancia concreta puede pertenecer a uno o varios de los grupos i. a iii. mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede tratarse de un polímero aniónico, que presenta uno o varios grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo. Una sustancia de este tipo pertenece entonces a los grupos i. y iii. Igualmente, un polímero catiónico, que presenta uno o varios grupo(s) hidroxilo y/o polihidroxilo, pertenece a los grupos ii. y iii.

En el contexto de la presente invención pueden utilizarse así mismo derivados de las sustancias denominadas que pertenecen a i., ii. o iii. Por un derivado se entiende en el sentido de la presente solicitud una sustancia tal que está modificada químicamente a partir de una de las sustancias mencionadas anteriormente, por ejemplo mediante la conversión de una cadena lateral o mediante enlace covalente de otro compuesto con la sustancia. En el caso de un compuesto de este tipo puede tratarse por ejemplo de compuestos de bajo peso molecular, tal como lípidos o mono-, oligo- o polisacáridos o aminas o compuestos de amina. Así mismo, la sustancia puede estar glicosilada, hidrolizada, oxidada, N-metilada, N-formilada, N-acetilada o puede contener metilo, formilo, etilo, acetilo, t-butilo, anisilo, bencilo, trifluoroacetilo, N-hidroxisuccinimida, t-butiloxicarbonilo, benzoílo, 4-metilbencilo, tioanizilo, tiocresilo, benciloximetilo, 4-nitrofenilo, benciloxicarbonilo, 2-nitrobenzoílo, 2-nitrofenilsulfenilo, 4-toluenosulfonilo, pentafluorofenilo, difenilmetilo, 2-clorobenciloxicarbonilo, 2,4,5-triclorofenilo, 2-bromobenciloxicarbonilo, 9-fluoroenilmetiloxicarbonilo, trifenilmetilo, 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo. Igualmente, por un derivado se entiende en enlace covalente o no covalente de la sustancia con un soporte macromolecular, así como también una inclusión no covalente en estructuras de jaula macromoleculares adecuadas. También puede efectuarse acoplamiento con otros compuestos macromoleculares, tal como, por ejemplo, polietilenglicol. Otras modificaciones químicas preferidas son la modificación de uno o varios de los grupos químicos -COOH, -OH, =NH, -NH₂ -SH para dar -COOR, -OR, -NHR, -NR₂, -NHR, -NR, -SR; en los que:

R es -CH=CH-R₂, -C≡C-R₂, -C(R₂)=CH₂, -C(R₂)=C(R₃), -CH=NR₂, -C(R₂)=N-R₃, un sistema de anillo de 4-7 C con o sin sustitución, un heterociclo de nitrógeno de 4-7 con o sin sustitución, o una cadena C₂ a C₈ con 1 a 5 dobles o triples enlaces con sustituciones seleccionadas de R₁, R₂, o R₃, en los que
 -R₁ es H, -R, -NO₂, -CN, sustituyente de halogenuro, -N₃, -alquilo C₁-8, -(CH₂)_nCO₂R₂, -alqueno C₂-8-CO₂R₂, -O(CH₂)_nCO₂R₂, -C(O)NR₂R₃, -P(O)(OR₂)₂, tetrazol-5-ilo sustituido con alquilo, -(CH₂)_nO(CH₂)_n arilo, -NR₂R₃, -(CH₂)_n OR₂, -(CH₂)_n SR₂, -N(R₂)C(O)R₃, -S(O₂)NR₂R₃, -N(R₂)S(O₂)R₃, -(CHR₂)_n NR₂R₃, -C(O)R₃, (CH₂)_n N(R₃)C(O)R₃, -N(R₂)CR₂R₃, (CH₂)_n- cicloalquilo sustituido o no sustituido, (CH₂)_n-fenilo, o -ciclo sustituido o no sustituido; siendo n un número mayor de 1;
 -R₂ es H, sustituyente de halogenuro, -alquilo, -haloalquilo, -(CH₂)_n-fenilo, -(CH₂)₁-3-bifenilo, -(CH₂)₁-4-Ph-N(SO₂-C₁-2-alquilo)₂, -CO(CHR₁)_n-OR₁, -(CHR₁)_n-heterociclo, -(CHR₁)_n-NH-CO-R₁, -(CHR₁)_n-NH-SO₂R₁, -(CHR₁)_n-Ph-N(SO₂-C₁-2-alquilo)₂, -(CHR₁)_n-C(O)(CHR₁)-NHR₁, -(CHR₁)_n-C(S)(CHR₁)-NHR₁, -(CH₂)_nO(CH₂)_nCH₃, -CF₃, -acilo C₂-C₅, -(CHR₁)_nOH, -(CHR₁)_nCO₂R₁, -(CHR₁)_n-O-alquilo, -(CHR₁)_n-O-(CH₂)_n-O-alquilo, -(CHR₁)_n-S-alquilo, -(CHR₁)_n-S(O)-alquilo, -(CHR₁)_n-S(O₂)-alquilo, -(CHR₁)_n-S(O₂)-NHR₃, -(CHR₃)_n-N₃, -(CHR₃)_nNHR₄, una cadena de alqueno de cadena C₂ a C₈ con 1 a 5 dobles enlaces, una cadena de alquino de cadena C₂ a C₈ con 1 a 5 triples enlaces, -(CHR₃)_n heterociclo sustituido o no sustituido, -(CHR₃)_n cicloalquilo saturado o no saturado sustituido o no sustituido; siendo n un número mayor de 1 y R₁ y R₃ pueden ser iguales o diferentes;
 -R₃ es H, -OH, -CN, alquilo sustituido, -alqueno C₂ a C₈, cicloalquilo sustituido o no sustituido, -N(R₁)R₂, heterociclo C₅ a C₇ saturado o no saturado o heterobociclo de 4 a 7 átomos de C, -NR₁, -NR₂, -NR₁R₂ consistiendo en un heterociclo saturado o no saturado o un heterobociclo de 4 a 7 átomos de C;
 -R₄ es H, -(CH₂)_nOH, -C(O)OR₅, -C(O)SR₅, -(CH₂)_n C(O)NR₆R₇, -O-C(O)-O-R₆, un aminoácido o un péptido; siendo n un número entre 0 y 4;
 -R₅ es H,

-R6 es -C(R7)-(CH₂)_n-O-C(O)-R8, -(CH₂)_n-C(R7)-O-C(O)-R8, -(CH₂)_n-C(R7)-O-C(O)-O-R8, o -C(R7)-(CH₂)_n-O-C(O)-O-R8; siendo n un número entre 0 y 4; y -R7 y R8 son en cada caso H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, o CH₂CO₂-alquilo, pudiendo ser R7 y R8 iguales o diferentes.

De acuerdo con la invención es además posible utilizar todas las combinaciones posibles de las sustancias mencionadas que pertenecen a i., ii. o iii. y/o sus derivados.

Un agente de lavado o de limpieza líquido de acuerdo con la invención puede utilizarse como tal o tras diluirse con agua para la limpieza de materiales textiles y/o superficies duras. Una dilución de este tipo puede producirse fácilmente, diluyéndose una cantidad medida del agente en otra cantidad de agua en determinadas relaciones en peso de agente : agua y opcionalmente esta dilución se agita para garantizar una distribución uniforme del agente en el agua. Posibles relaciones en peso o volumen de las diluciones son de agente : agua 1:0 a agente : agua 1:10000 o 1:20000, preferentemente de agente : agua 1:10 a 1:2000.

Como agentes de lavado o de limpieza líquidos pueden servir en este sentido todas las formas de administración líquidas o fluidas. "Fluido" en el sentido de la presente solicitud son a este respecto agentes, que pueden colarse y que pueden presentar viscosidades de hasta varios 10.000 mPas. La viscosidad puede medirse con métodos estándar habituales (por ejemplo viscosímetro Brookfield LVT-II a 20 rpm y 20 °C, husillo 3) y se encuentra preferentemente en el intervalo de 5 a 10000 mPas. Los agentes preferidos tienen viscosidades de 10 a 8000 mPas, prefiriéndose especialmente valores entre 120 y 3000 mPas. Un agente de lavado o de limpieza líquido en el contexto de la presente invención puede estar por lo tanto también en forma de gel o en forma de pasta, puede encontrarse como solución o suspensión homogénea, así como puede ser por ejemplo rociable o puede estar confeccionado en otras formas de administración habituales. Entre los agentes de lavado figuran todos los tipos de agentes de lavado concebibles, en particular agentes de lavado para materiales textiles, alfombras o fibras naturales. Pueden estar previstos para el uso manual y/o también el uso a máquina. Entre los agentes de lavado figuran así mismo agentes auxiliares de lavado, que en el caso de la colada textil a mano o a máquina, se añaden al verdadero agente de lavado para conseguir un efecto adicional. Entre los agentes de limpieza figuran todos los agentes que se encuentran así mismo en todas las formas de administración mencionadas para la limpieza y/o desinfección de superficies duras, agentes lavavajillas a mano y a máquina, limpiadores de alfombras, productos de limpieza, limpiacristales, limpiadores con aroma para WC, etc. Los agentes de tratamiento previo y posterior para materiales textiles son, por último, por un lado, aquellos agentes con los que se pone en contacto la prenda de ropa antes del verdadero lavado, por ejemplo para disolver ensuciamientos resistentes, por otro lado, son aquellos que en una etapa posterior al verdadero lavado de material textil confieren al material que va a lavarse propiedades deseables adicionales tal como tacto agradable, ausencia de arrugas o baja carga estática. Entre los agentes mencionados en último lugar figura, entre otros, los suavizantes. Los agentes desinfectantes son por ejemplo agentes desinfectantes para manos, agentes desinfectantes de superficies y agentes desinfectantes para instrumentos, que pueden encontrarse igualmente en las formas de administración mencionadas.

En una forma de realización preferida adicional de la invención, el agente de lavado o de limpieza se caracteriza porque comprende al menos una sustancia contenida adicional, en particular una, que se selecciona del grupo que consiste en fosfonato, tensioactivo, adyuvante (*builder*), disolvente no acuoso, ácido, sal soluble en agua, espesante así como combinaciones de los mismos.

Los fosfonatos son sales y compuestos orgánicos, en particular ésteres, del ácido fosfónico. Como sales existen fosfonatos primarios (M'H₂PO₃ o HP(O)(OH)(OM')) y secundarios (M'₂HPO₃ o HP(O)(OM')₂), representando M' un metal monovalente. Estos fosfonatos inorgánicos se denominan también fosfitos primarios o secundarios. Los fosfonatos inorgánicos se generan por ejemplo mediante reacción de ácido fosfónico HP(O)(OH)₂, en particular de la forma tautomérica estable del ácido fosforoso con un equivalente (primario) o dos equivalentes (secundario) de base, por ejemplo hidróxido de metal alcalino. En el contexto de la presente invención se prefieren fosfonatos sustituidos con P de manera orgánica, que presentan 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, pudiendo portar los restos alquilo o arilo sustituciones adicionales o grupos químicos adicionales. Los fosfonatos sustituidos con P de manera orgánica se generan por ejemplo mediante reacción de Michaelis-Arbusov. Muchos de estos fosfonatos son solubles en agua. Algunos fosfonatos importantes desde el punto de vista técnico portan así mismo grupo(s) amino a modo de NR-(CH₂)_x-PO(OH)₂ (R = alquilo, arilo o H). Algunos de estos aminofosfonatos tienen similitudes estructurales con agentes complejantes tal como EDTA, NTA o DTPA y tienen una función similar. Entre los fosfonatos especialmente preferidos en el contexto de la presente invención figuran en particular organofosfonatos tal como por ejemplo ácido 1-hidroxietan-1,1-difosfónico (HEDP), ácido aminotri(metilenfosfónico) (ATMP, también denominado ácido aminotris(metilenfosfónico) o ácido nitrolotris(metilenfosfónico) (NTMP)), ácido dietilentriamin-penta(metilenfosfónico) (DTPMP o DETPMP o DTPNT), ácido etilendiamintetra(metilenfosfónico) (EDTMP, también denominado ácido etilendiamin-tetra(metilenfosfónico) así como ácido 2-fosfonobutan-1,2,4-tricarboxílico (PBS-AM, también denominado ácido 2-fosfonobutan-1,2,4-tricarboxílico o ácido 3-carboxi-3-fosfonoadípico), que se utilizan principalmente en forma de sus sales de amonio o de metal alcalino. Se prefiere especialmente ácido dietilentriamin-penta(metilenfosfónico)-sodio. Un fosfonato de este tipo puede obtenerse por ejemplo con el nombre comercial Dequest® 2066 (empresa Thermphos).

Preferentemente, el fosfonato está contenido en una cantidad del 0,01 al 2,5 % en peso y más preferentemente del 0,02 al 2 % en peso, del 0,03 al 1,5 % en peso y en particular del 0,05 al 1 % en peso en el agente de lavado o de limpieza.

5 Como tensioactivo(s) pueden utilizarse tensioactivos aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos y/o anfóteros. Desde el punto de vista de la técnica de aplicación se prefieren mezclas de tensioactivos aniónicos y no iónicos. El contenido en tensioactivo total del agente de lavado o de limpieza líquido se encuentra preferentemente por debajo del 60 % en peso y de manera especialmente preferente por debajo del 45 % en peso, con respecto a todo el agente de lavado o de limpieza líquido.

10 Tensioactivos no iónicos adecuados comprenden alcoholes grasos alcoxilados, ésteres alquílicos de ácido graso, amidas de ácido graso, amidas de ácido graso alcoxiladas, amidas de ácido polihroxigraso, alquilfenolpoliglicol éter, aminóxidos, alquilpoliglucósidos y mezclas de los mismos.

15 Como tensioactivos no iónicos se utilizan preferentemente alcoholes alcoxilados, de manera ventajosa etoxilados, en particular alcoholes primarios con preferentemente 8 a 18 átomos de C y en promedio de 1 a 12 moles de óxido de etileno (OE) por mol de alcohol, en los que el resto alcohol puede ser lineal o preferentemente estar ramificado con metilo en la posición 2 o puede contener restos lineales y ramificados con metilo en la mezcla, tal como se encuentran habitualmente en los restos oxoalcohol. En particular se prefieren sin embargo etoxilatos de alcohol con restos lineales de alcoholes de origen nativo con 12 a 18 átomos de C, por ejemplo de alcohol de coco, de palma, de grasa de sebo o alcohol oleílico, y en promedio de 2 a 8 OE por mol de alcohol. Entre los alcoholes etoxilados preferidos figuran por ejemplo alcoholes C₁₂₋₁₄ con 3 OE, 4 OE o 7 OE, alcohol C₉₋₁₁ con 7 OE, alcoholes C₁₃₋₁₅ con 3 OE, 5 OE, 7 OE o 8 OE, alcoholes C₁₂₋₁₈ con 3 OE, 5 OE o 7 OE y mezclas de los mismos, tal como mezclas de alcohol C₁₂₋₁₄ con 3 OE y alcohol C₁₂₋₁₈ con 7 OE. Los grados de etoxilación indicados representan valores medios estadísticos que, para un producto especial, pueden ser un número entero o un número fraccionado. Los etoxilados de alcohol preferidos presentan una estrecha distribución de homólogos (*narrow range etoxylates*, NRE). Además de estos tensioactivos no iónicos pueden utilizarse también alcoholes grasos con más de como 12 OE. Ejemplos de ello son alcohol de grasa de sebo con 14 OE, 25 OE, 30 OE o 40 OE. También pueden utilizarse de acuerdo con la invención tensioactivos no iónicos, que contienen grupos OE y PO juntos en la molécula. Son adecuados así mismo también una mezcla de un alcohol graso (más) ramificado y un alcohol graso etoxilado no ramificado, tal como por ejemplo una mezcla de un alcohol graso C₁₆₋₁₈ con 7 OE y 2-propilheptanol con 7 OE. En particular, preferentemente, el agente de lavado, de limpieza, de tratamiento posterior o agente auxiliar de lavado contiene un alcohol graso C₁₂₋₁₈ con 7 OE o un oxoalcohol C₁₃₋₁₅ con 7 OE como tensioactivo no iónico.

El contenido en tensioactivos no iónicos asciende, en el agente de lavado o de limpieza, preferentemente a del 3 al 40 % en peso, preferentemente del 5 al 30 % en peso y en particular del 7 al 20 % en peso, en cada caso con respecto a todo el agente de lavado o de limpieza.

35 Además de los tensioactivos no iónicos, el agente de lavado o de limpieza puede contener también tensioactivos aniónicos. Como tensioactivo aniónicos se utilizan preferentemente sulfonatos, sulfatos, jabones, alquilfosfatos, tensioactivos de silicona aniónicos y mezclas de los mismos.

40 Como tensioactivos de tipo sulfonato se tienen en cuenta a este respecto preferentemente alquilbencenosulfonatos C₉₋₁₃, olefinsulfonatos, es decir mezclas de alquen- e hidroxialcanosulfonatos así como disulfonatos, tal como se obtienen por ejemplo a partir de monoolefinas C₁₂₋₁₈ doble enlace de extremo o interno mediante sulfonación con trióxido de azufre gaseoso y posterior hidrólisis alcalina o ácida de los productos de sulfonación. Son adecuados también alcanosulfonatos C₁₂₋₁₈ y los ésteres de ácidos α-sulfograsos (estersulfonatos), por ejemplo los ésteres metílicos α-sulfonados de los ácidos de coco, de palmiste o de grasa de sebo hidrogenados.

45 Como alqu(en)ilsulfatos se prefieren las sales alcalinas y en particular las sales de sodio de los hemiésteres de ácido sulfúrico de los alcoholes grasos C_{12-C18}, por ejemplo de alcohol graso de coco, alcohol de grasa de sebo, alcohol laurílico, miristílico, cetílico o estearílico o de los oxoalcoholes C_{10-C20} y aquellos hemiésteres de alcoholes secundarios de estas longitudes de cadena. Por intereses técnicos de lavado, se prefieren los alquilsulfatos C_{12-C16} y alquilsulfatos C_{12-C15} así como alquilsulfatos C_{14-C15}. También 2,3-alquilsulfatos son tensioactivos aniónicos adecuados.

50 También son adecuados los monoésteres del ácido sulfúrico de los alcoholes C₇₋₂₁ lineales o ramificados etoxilados con 1 a 6 moles de óxido de etileno, tal como alcoholes C₉₋₁₁ 2-metil-ramificados con, en promedio, 3,5 moles de óxido de etileno (OE) o alcoholes grasos C₁₂₋₁₈ con 1 a 4 OE.

55 También son tensioactivos aniónicos preferidos los jabones. Son adecuados jabones de ácido graso saturados e insaturados, tal como las sales del ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido erúrico (hidrogenado) y ácido behénico así como en particular mezclas de jabones derivadas de ácidos grasos naturales, por ejemplo ácidos grasos de coco, de palmiste, de aceite de oliva o de sebo.

Los tensioactivos aniónicos inclusive los jabones, pueden encontrarse en forma de sus sales de sodio, potasio o magnesio o sales de amonio. Preferentemente, los tensioactivos aniónicos se encuentran en forma de sus sales de sodio. Otros contraiones preferidos para los tensioactivos aniónicos son también las formas protonadas de colina,

triethylamina o metiletilamina.

El contenido de un agente de lavado o de limpieza en tensioactivos aniónicos puede ascender a del 1 al 40 % en peso, preferentemente del 5 al 30 % en peso y de manera muy especialmente preferente del 10 al 25 % en peso, en cada caso con respecto a todo el agente de lavado o de limpieza.

- 5 Como adyuvantes (*builder*), que pueden estar contenidos en el agente de lavado o de limpieza, pueden mencionarse en particular silicatos, silicatos de aluminio (en particular zeolitas), carbonatos, sales de ácidos di- y policarboxílicos orgánicos así como mezclas de estas sustancias.

Los adyuvantes orgánicos, que pueden estar presentes en el agente de lavado o de limpieza, son por ejemplo los ácidos policarboxílicos que pueden utilizarse en forma de sus sales de sodio, entendiéndose por ácidos policarboxílicos aquellos ácidos carboxílicos que portan más de una función ácido. Por ejemplo, estos son ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácidos de azúcar, ácidos aminocarboxílicos, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido metilglucindiacético (MGDA) y sus derivados así como mezclas de los mismos. Sales preferidas son las sales de los ácidos policarboxílicos tal como ácido cítrico, ácido adípico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido tartárico, ácidos de azúcar y mezclas de los mismos.

Como adyuvantes son adecuados además policarboxilatos poliméricos. Estos son por ejemplo las sales de metal alcalino del poli(ácido acrílico) o del poli(ácido metacrílico), por ejemplo aquellos con un peso molecular relativo de 600 a 750.000 g / mol.

20 Polímeros adecuados son en particular poliácridatos, que presentan preferentemente un peso molecular de 1.000 a 15.000 g / mol. Debido a su solubilidad superior, de este grupo, pueden preferirse a su vez, los poliácridatos de cadena corta, que presentan pesos moleculares de 1.000 a 10.000 g / mol, y de manera especialmente preferente de 1.000 a 5.000 g / mol.

25 Son adecuados además policarboxilatos copoliméricos, en particular aquellos del ácido acrílico con ácido metacrílico y del ácido acrílico o ácido metacrílico con ácido maleico. Para mejorar la solubilidad en agua, los polímeros pueden contener también ácidos alilsulfónicos, tal como ácido aliloxibencenosulfónico y ácido metalilsulfónico, como monómero.

Preferentemente se utilizan no obstante adyuvantes solubles, tal como por ejemplo ácido cítrico, o polímeros acrílicos con un peso molecular de 1.000 a 5.000 g / mol preferentemente en los agentes de lavado o de limpieza líquidos.

30 En el caso de los pesos moleculares indicados para policarboxilatos poliméricos se trata, en el sentido de este documento, de pesos moleculares promedio en peso M_w de la forma de ácido respectiva, que se determinaron por medio de cromatografía de permeación en gel (CPG), utilizándose un detector UV. La medición tuvo lugar a este respecto frente a un patrón externo de poli(ácido acrílico), que debido a su semejanza estructural con los polímeros examinados, proporciona valores de peso molecular realistas. Estos datos se desvían claramente de los datos de peso molecular, en los que se utilizan poli(ácidos estirenosulfónicos) como patrón. Los pesos moleculares medidos frente a poli(ácidos estirenosulfónicos) son por regla general claramente mayores que los pesos moleculares indicados en este documento.

40 Las sustancias *builder* orgánicas de este tipo pueden estar contenidas, si se desea, en cantidades hasta el 40 % en peso, en particular hasta el 25 % en peso y preferentemente del 1 % en peso al 8 % en peso. Cantidades próximas al límite superior mencionado se utilizan preferentemente en agentes en forma de pasta o líquidos, en particular agentes que contienen agua.

Los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención son líquidos y contienen preferentemente agua como disolvente principal. Además, pueden añadirse al agente de lavado o de limpieza disolventes no acuosos. Los disolventes no acuosos adecuados comprenden alcoholes mono- o polivalentes, alcanolaminas o glicol éteres, siempre que puedan mezclarse con agua en el intervalo de concentración indicado. Preferentemente, los disolventes se seleccionan de etanol, n-propanol, i-propanol, butanoles, glicol, propanodiol, butanodiol, glicerol, diglicol, propildiglicol, butildiglicol, hexilenglicol, etilenglicolmetil éter, etilenglicoletil éter, etilenglicolpropil éter, etilenglicolmono-n-butil éter, dietilenglicolmetil éter, dietilenglicoletil éter, propilenglicolmetil éter, propilenglicoletil éter, propilenglicolpropil éter, dipropilenglicolmonometil éter, dipropilenglicolmonoetil éter, diisopropilenglicolmonometil éter, diisopropilenglicolmonoetil éter, metoxitriglicol, etoxitriglicol, butoxitriglicol, 1-butoxi-2-propanol, 3-metil-3-metoxibutanol, propilen-glicol-t-butil éter, di-n-octil éter así como mezclas de estos disolventes. No obstante se prefiere que el agente de lavado o de limpieza contenga un poliol como disolvente no acuoso. El poliol puede comprender en particular glicerol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, etilenglicol, dietilenglicol y/o dipropilenglicol. En particular, preferentemente, el agente de lavado o de limpieza contiene una mezcla de un poliol y un alcohol monovalente. Los disolventes no acuosos pueden utilizarse en el agente de lavado o de limpieza en cantidades entre el 0,5 y el 15 % en peso, pero preferentemente por debajo del 12 % en peso.

Para el ajuste de un valor de pH deseado, que no resulta en sí mediante la mezcla de los componentes restantes, los agentes pueden contener ácidos compatibles con el sistema y el medio ambiente, en particular ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido glutárico y/o ácido adípico, pero también ácidos minerales, en particular ácido sulfúrico, o bases, en particular hidróxidos de amonio o alcalinos. Los reguladores de pH de este tipo están contenidos en los agentes en cantidades de preferentemente no por encima del 20 % en peso, en particular del 1,2 % en peso al 17 % en peso.

Un agente en el sentido de la invención puede contener además una o varias sales solubles en agua, que sirven por ejemplo para el ajuste de la viscosidad. Puede tratarse a este respecto de sales inorgánicas y/u orgánicas. Las sales inorgánicas que pueden utilizarse se seleccionan a este respecto preferentemente del grupo que comprende halogenuros solubles en agua incoloros, sulfatos, sulfitos, carbonatos, hidrogenocarbonatos, nitratos, nitritos, fosfatos y/u óxidos de los metales alcalinos, de los metales alcalinotérreos, del aluminio y/o de los metales de transición; además pueden utilizarse sales de amonio. Se prefieren especialmente a este respecto halogenuros y sulfatos de los metales alcalinos; preferentemente la sal inorgánica se selecciona por lo tanto del grupo que comprende cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, sulfato de potasio así como mezclas de los mismos. Las sales orgánicas que pueden utilizarse son por ejemplo sales de metal alcalino, de metal alcalinotérreo, de amonio y/o de metal de transición solubles en agua incoloras de los ácidos carboxílicos. Preferentemente las sales se seleccionan del grupo que comprende formiato, acetato, propionato, citrato, malato, tartrato, succinato, malonato, oxalato, lactato así como mezclas de los mismos.

Para espesar, un agente de acuerdo con la invención puede contener uno o varios espesantes. Preferentemente el espesante se selecciona del grupo que comprende goma xantana, goma guar, carragenanos, agar-agar, gellan, pectina, harina de semilla de algarrobo y mezclas de los mismos. Estos compuestos son espesantes efectivos también en presencia de sales inorgánicas. En una forma de realización especialmente preferida, el agente de lavado o de limpieza contiene goma xantana como espesante, dado que la goma xantana espesa de manera efectiva también en presencia de altas concentraciones de sal e impide una separación macroscópica de la fase continua. Adicionalmente, el espesante estabiliza la fase continua, pobre en tensioactivos e impide una separación de fases macroscópica.

Como alternativa o de manera complementaria, pueden utilizarse también (co)polímeros de ácido (met)acrílico como espesante. Los (co)polímeros acrílicos o metacrílicos adecuados comprenden por ejemplo los homopolímeros del ácido acrílico reticulados con un polialquienilpoliéter, en particular un alil éter de sacarosa, pentaeritritol o propileno, (denominación INCI según "International Dictionary of Cosmetic Ingredients" de la "The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA)": carbómero), que se denominan también copolímeros de carboxivinilo. Tales poli(ácidos acrílicos) pueden obtenerse, entre otros, con 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 simples, formados preferentemente con alcoholes C₁₋₄, (INCI Acrylates Copolymer), que pueden obtenerse por ejemplo con los nombres comerciales Aculyn®, Acusol® o Tego® Polymer; (ii) copolímeros de ácido acrílico de alto peso molecular reticulados, a los que pertenecen por ejemplos los copolímeros, reticulados con un alil éter de sacarosa o de pentaeritritol, de acrilatos de alquilo C₁₀₋₃₀ con uno o varios monómeros del grupo del ácido acrílico, ácido metacrílico y sus ésteres simples, formados preferentemente con alcoholes C₁₋₄ (INCI Acrylates/ C₁₀₋₃₀ Alkyl Acrylate Crosspolymer) y que pueden obtenerse por ejemplo con 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 de limpieza de acuerdo con la invención contenga un (co)polímero de ácido (met)acrílico en combinación con un espesante adicional, preferentemente goma xantana. El agente de lavado o de limpieza puede contener del 0,05 al 1,5 % en peso y preferentemente del 0,1 al 1 % en peso, en cada caso con respecto a todo el agente de lavado o de limpieza, de espesante. La cantidad de espesante utilizado depende a este respecto del tipo de espesante y el grado de espesamiento deseado.

Las soluciones que contienen agentes de acuerdo con la invención líquidos o pastosos en forma de disolventes habituales se producen por regla general mediante mezclado sencillo de las sustancias contenidas que pueden añadirse en sustancia o como solución a una mezcladora automática.

Los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención pueden contener exclusivamente una proteasa y una lipasa tal como se describe. Como alternativa, pueden contener también otras enzimas hidrolíticas u otras enzimas en una concentración conveniente para la eficacia del agente. Otro objeto de la invención lo representan por lo tanto agentes que comprenden así mismo una o varias enzimas adicionales, pudiendo utilizarse en principio todas las enzimas establecidas para este fin en el estado de la técnica. Como enzimas adicionales pueden utilizarse preferentemente todas las enzimas que pueden desarrollar una actividad catalítica en el agente de acuerdo con la invención, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanas, xantanasa, xiloglucanasa, β-glucosidasa, pectinasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidoreductasa o una lipasa, así como sus mezclas. Otras enzimas están contenidas en el agente de manera ventajosa en cada caso en una cantidad total de 1×10^{-8} a 5 por ciento en peso con respecto a proteína activa. Preferentemente cada enzima está contenida del 0,0001-1 % y más preferentemente del 0,0005-0,5 %, del 0,001 al 0,1 % y de manera especialmente preferente del 0,001 al 0,06 % en peso, en los agentes de acuerdo con la invención, con respecto a proteína activa. De manera

especialmente preferente, las enzimas muestran poderes de limpieza sinérgicos frente a determinados ensuciamientos o manchas, es decir las enzimas contenidas en la composición del agente se apoyan en su poder de limpieza. De manera muy especialmente preferente, una sinergia de este tipo existe entre la proteasa contenida de acuerdo con la invención y una enzima adicional de un agente de acuerdo con la invención, entre ellas en particular entre la proteasa mencionada y la lipasa y/o una amilasa y/o una manasa y/o una celulasa y/o una pectinasa. Efectos sinérgicos no solo pueden aparecer entre distintas enzimas, sino también entre una o varias enzimas y otras sustancias contenidas del agente de acuerdo con la invención.

Un objeto de la invención adicional representa el uso de un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención para la eliminación de ensuciamientos, en particular de ensuciamientos sensibles a proteasa y/o lipasa, sobre materiales textiles o superficies duras, es decir para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras. Entonces los agentes de acuerdo con la invención pueden, en particular debido a la combinación contenida de proteasa y lipasa, de manera ventajosa usarse para eliminar suciedades correspondientes de materiales textiles o de superficies duras. Formas de realización de este objeto de la invención representan por ejemplo el lavado a mano, la eliminación manual de manchas de materiales textiles o de superficies duras o el uso en relación con un procedimiento a máquina. Todos los estados, objetos y formas de realización, que se describen para agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención pueden emplearse también a este objeto de la invención. Por lo tanto se remite en este punto expresamente a la divulgación en el punto correspondiente con la indicación de que esta divulgación es también válida para el uso de acuerdo con la invención anterior.

Otro objeto de la invención representa un procedimiento para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, empleándose en al menos una etapa de procedimiento un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención.

Entre ellos entra tanto procedimientos a mano como a máquina, prefiriéndose los procedimientos a máquina debido a su capacidad de control más precisa, lo que afecta por ejemplo a las cantidades utilizadas y los tiempos de acción. Los procedimientos para la limpieza de materiales textiles se caracterizan en general por que en varias etapas de procedimiento en distintas sustancias activas para la limpieza se aplica sobre el material a limpiar y se aclara después del tiempo de acción, o porque el material a limpiar se trata de otra manera con un agente de lavado o una solución o dilución de este agente. Lo correspondiente es válido para procedimientos para la limpieza de todos los otros materiales como materiales textiles, en particular de superficies duras. Todos los procedimientos de lavado o limpieza concebibles pueden enriquecerse en al menos una de las etapas de procedimiento para la aplicación de un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención y representan entonces formas de realización de la presente invención. Todos los estados, objetos y formas de realización, que se describen para los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención pueden emplearse también en este objeto de la invención. Por lo tanto, en este punto se remite expresamente a la divulgación en el punto correspondiente con la indicación de que esta divulgación también es válida para los procedimientos de acuerdo con la invención anteriores.

En una forma de realización preferida, el procedimiento se caracteriza porque la lipasa se encuentra en las aguas de lavado en una concentración del 0,00075 al 0,03 % en peso, preferentemente del 0,003 al 0,027 % en peso, y/o porque la proteasa se encuentra en las aguas de lavado en una concentración del 0,00075 al 0,03 % en peso, preferentemente del 0,003 al 0,027 % en peso. Los datos de concentración son con respecto a la totalidad de las aguas de lavado. En una forma de realización preferida adicional, el procedimiento se caracteriza porque se lleva a cabo a una temperatura entre 10 °C y 50 °C, preferentemente entre 10 °C y 40 °C y de manera especialmente preferente entre 20 °C y 40 °C.

Las proteasas utilizadas en los agentes de acuerdo con la invención pueden utilizarse de manera correspondiente a las realizaciones anteriores de manera ventajosa en los agentes de lavado y de limpieza de acuerdo con la invención así como procedimientos, en particular procedimientos de lavado y de limpieza. Pueden usarse de manera ventajosa para proporcionar una actividad proteolítica en agentes correspondientes.

Otro objeto de la invención forma por lo tanto el uso de una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 en al menos el 80 % y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta el aminoácido ácido glutámico (E), para la provisión de una actividad proteolítica en un agente de lavado o de limpieza líquido, que comprende así mismo una lipasa.

En una forma de realización adicional, este uso se caracteriza porque la proteasa así mismo en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta al menos uno de los siguientes aminoácidos:

- (a) treonina en la posición 3 (3T),
- (b) isoleucina en la posición 4 (4I),
- (c) alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),
- (d) ácido aspártico 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 aspártico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
 (i) combinaciones de los aminoácidos (a) a (h).

Otro objeto de la invención lo forma el uso de una proteasa, que se selecciona del grupo que consiste en

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

5 b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en al menos una posición con respecto a la SEQ ID NO. 2, seleccionándose la modificación en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 del grupo que consiste en:

- 10 i. treonina en la posición 3 (3T),
 ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
 iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),
 iv. ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
 v. prolina en la posición 188 (188P),
 vi. metionina en la posición 193 (193M),
 vii. isoleucina en la posición 199 (199I),
 15 viii. ácido aspártico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
 ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);

para la provisión de una actividad proteolítica en un agente de lavado o de limpieza líquido, que comprende así mismo una lipasa.

20 Todos los estados, objetos y formas de realización, que se describen para los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención, pueden emplearse también en los usos mencionados. Por lo tanto se remite en este punto expresamente a la divulgación en el punto correspondiente con la indicción de que esta divulgación es válida también para los usos de acuerdo con la invención anteriores.

Ejemplo: Determinación de la estabilidad en almacenamiento de agentes de lavado líquidos de acuerdo con la invención

25 Como formulaciones de base de agente de lavado sirvieron

- a) Un primer agente de lavado líquido de la siguiente composición (todos los datos en por ciento en peso): 0,3-0,5 % de goma xantana, 0,2-0,4 % de antiespumante, 6-7 % de glicerol, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS (éter sulfato de alcohol graso), 24-28 % de tensioactivos no iónicos, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato de sodio (dihidratado), 2-4 % de sosa, 14-16 % de ácidos grasos de coco, 0,5 % de HEDP (ácido 1-hidroxietan-(1,1-difosfónico)), 0-0,4 %
 30 de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05 % de blanqueante óptico, 0-0,001 % de colorante, el resto agua desmineralizada. Como lipasa estaba contenido el 0,1 % en peso de Lipex 100L (empresa Novozymes, contenido en sustancia activa 1,9 %).

b) Un segundo agente de lavado líquido de la siguiente composición:

Sustancia contenida	% en peso
Alcohol graso C ₁₂₋₁₈ con 7 OE	6,40
Alquilbencenosulfonato C ₁₀ -C ₁₃ lin. (sal de Na)	5,35
Ácido graso C ₁₂₋₁₈ (sal de Na)	2,00
Ácido cítrico (sal de Na)	1,20
Fosfonato (Dequest® 2066)	0,50
Ácido bórico (sal de Na)	1,00
Espesante de poliacrilato	0,15
Glicerol	3,00
Etanol	1,00
Desespumante de silicona	0,01
Perfume	0,70
Colorante, conservante	+
Agua	hasta 100

Como lipasa estaba contenido el 0,2 % en peso de Lipex 100L (empresa Novozymes, contenido en sustancia activa 1,9 %). Las formulaciones de base de agente de lavado se mezclaron para las distintas preparaciones de ensayo a igual concentración con respecto a proteína activa con las siguientes proteasas, utilizándose en el agente de lavado líquido según a) 0,45 mg de proteasa (proteína activa) y en el agente de lavado líquido según b) 0,27 mg de proteasa (proteína activa) por gramo de agente de lavado: proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 2 (Glu en la posición 99 (99E), preparación 1), variante F49 de rendimiento mejorado de la proteasa de *Bacillus lentus* según el documento WO 95/23221 (Arg en la posición 99 (99R), preparación 2) y la proteasa divulgada en la Figura 2 o SEQ ID NO. 3 de la publicación para información de solicitud de patente internacional WO 03/057713 (Ser en la posición 99 (99S), identidad con la SEQ ID NO. 1 < 80 %, preparación 3).

Los agentes de lavado según las preparaciones respectivas 1, 2 y 3 se examinaron en cuanto a su estabilidad en almacenamiento. Para ello se almacenaron los agentes de lavado a una temperatura de 30 °C durante el periodo de tiempo indicado en cada caso y se determinó la actividad residual lipolítica respectiva tal como se describe en Bruno Stellmach, "Bestimmungsmethoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin" (Steinkopff Verlag Darmstadt, 1988, página 172 y siguientes): se añadieron muestras que contienen lipasa a una emulsión de aceite de oliva en agua que contiene emulsionante y se incubó a 30 °C y pH 9,0. A este respecto se liberaron ácidos grasos. Estos se valoraron con un autotitulador durante 20 min de manera continua con hidróxido de sodio 0,01 N, de modo que el valor de pH permanecía constante (pH-stat-Titration). Por medio del consumo de hidróxido de sodio tuvo lugar mediante referencia a una muestra de lipasa de referencia, la determinación de la actividad lipasa. Las actividad residuales lipolíticas obtenidas están indicadas en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Agente de lavado según	a)			b)		
	Inicio	4 semanas	8 semanas	Inicio	4 semanas	8 semanas
Preparación 1	100 %	78 %	64 %	100 %	59 %	38 %
Preparación 2	100 %	59 %	38 %	100 %	53 %	34 %
Preparación 3	100 %	53 %	25 %	100 %	36 %	10 %

Es evidente que los agentes de lavado de acuerdo con la invención presentan una actividad residual lipolítica y, con ello, una estabilidad en almacenamiento, claramente mejorada en comparación con los agentes de lavado de las preparaciones 2 y 3.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Agente de lavado o de limpieza líquido estable en almacenamiento que contiene proteasa y lipasa

<130> H 09005 PCT

<150> DE 102010028951

<151> 12/05/2010

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> *Bacillus lentus*

<400> 1

ES 2 559 882 T3

Ala	Gln	Ser	Val	Pro	Trp	Gly	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Pro	Ala	Ala	
1				5					10					15		
His	Asn	Arg	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Val	Lys	Val	Ala	Val	Leu	Asp	
			20					25					30			
Thr	Gly	Ile	Ser	Thr	His	Pro	Asp	Leu	Asn	Ile	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	
		35					40					45				
Phe	Val	Pro	Gly	Glu	Pro	Ser	Thr	Gln	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	Thr	
	50					55					60					
His	Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	
65					70					75					80	
Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	
				85					90					95		
Asp	Gly	Arg	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ala	
			100					105					110			
Gly	Asn	Asn	Gly	Met	His	Val	Ala	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser	
	115						120					125				
Pro	Ser	Ala	Thr	Leu	Glu	Gln	Ala	Val	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly	
	130					135					140					
Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Ile	Ser	
145					150					155					160	
Tyr	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln	
				165					170					175		

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Bacillus lentus

5

<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

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 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

5 <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 1	Gln	Ser	Val 5	Pro	Trp	Gly	Ile	Ser	Arg 10	Val	Gln	Ala	Pro	Ala 15	Ala
His	Asn	Arg	Gly 20	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly 25	Val	Lys	Val	Ala	Val 30	Leu	Asp
Thr	Gly	Ile 35	Ser	Thr	His	Pro	Asp 40	Leu	Asn	Ile	Arg	Gly 45	Gly	Ala	Ser
Phe	Val 50	Pro	Gly	Glu	Pro	Ser 55	Thr	Gln	Asp	Gly	Asn 60	Gly	His	Gly	Thr
His 65	Val	Ala	Gly	Thr	Ile 70	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn 75	Ser	Ile	Gly	Val	Leu 80
Gly	Val	Ala	Pro 85	Ser	Ala	Glu	Leu	Tyr	Ala 90	Val	Lys	Val	Leu	Gly 95	Ala
Asp	Gly	Gly 100	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Ile 105	Ala	Gln	Gly	Leu	Glu 110	Trp	Ala
Gly	Asn 115	Asn	Gly	Met	His	Val	Ala 120	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly 125	Ser	Pro	Ser
Pro	Ser 130	Ala	Thr	Leu	Glu	Gln 135	Ala	Val	Asn	Ser	Ala 140	Thr	Ser	Arg	Gly
Val 145	Leu	Val	Val	Ala 150	Ala	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly 155	Ala	Ser	Ser	Ile	Ser 160
Tyr	Pro	Ala	Arg 165	Tyr	Ala	Asn	Ala	Met	Ala 170	Val	Gly	Ala	Thr	Asp 175	Gln
Asn	Asn	Asn 180	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Gln 185	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu 190	Asp	Ile

ES 2 559 882 T3

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

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 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

ES 2 559 882 T3

145		150		155		160									
Tyr	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln
				165					170					175	
Asn	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile
			180					185					190		
Val	Ala	Pro	Gly	Val	Asn	Val	Gln	Ser	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Thr	Tyr
		195					200					205			
Ala	Ser	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala
	210					215					220				
Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	Asn	Pro	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Gln	Ile
225					230					235					240
Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu
				245					250					255	
Tyr	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg			
			260					265							

REIVINDICACIONES

1. Detergente o agente de limpieza líquido que comprende

- 5 (a) una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 en al menos el 80 % y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta el aminoácido ácido glutámico (E),
y
(b) una lipasa.

2. Detergente o agente de limpieza de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la proteasa en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta además al menos uno de los siguientes aminoácidos:

- 10 (a) treonina en la posición 3 (3T),
(b) isoleucina en la posición 4 (4I),
(c) alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61R),
(d) ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
15 (e) prolina en la posición 188 (188P),
(f) metionina en la posición 193 (193M),
(g) isoleucina en la posición 199 (199I),
(h) ácido aspártico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
(i) combinaciones de los aminoácidos (a) a (h).

3. Detergente o agente de limpieza líquido que comprende

- 20 (a) una proteasa, que se selecciona del grupo que consiste en
a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 2;
b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en al menos una posición con respecto a la SEQ ID NO. 2, seleccionándose la modificación en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 del grupo que consiste en:
25 i. treonina en la posición 3 (3T),
ii. isoleucina en la posición 4 (4I),
iii. alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),
iv. ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
v. prolina en la posición 188 (188P),
30 vi. metionina en la posición 193 (193M),
vii. isoleucina en la posición 199 (199I),
viii. ácido aspártico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);
(b) una lipasa.

35 4. Detergente o agente de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la lipasa está contenida en una cantidad de 1×10^{-8} a 5 por ciento en peso, con respecto a proteína activa, y/o porque la proteasa está contenida en una cantidad de 1×10^{-8} a 5 por ciento en peso, con respecto a proteína activa.

5. Detergente o agente de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** comprende además un componente, que se selecciona de

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

6. Detergente o agente de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** comprende al menos un componente adicional, en particular uno, que se selecciona del grupo que consiste en fosfonato, tensioactivo, adyuvante (*builder*), disolvente no acuoso, ácido, sal soluble en agua, espesante así como combinaciones de los mismos.

7. Detergente o agente de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** comprende al menos una enzima adicional, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, manasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, β -glucosidasa, pectinasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidoreductasa o una lipasa, así como sus mezclas.

8. Uso de un detergente o agente de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 para la eliminación de ensuciamientos sensibles a proteasa sobre materiales textiles o superficies duras.

9. Procedimiento para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, **caracterizado porque** en al menos una etapa de procedimiento se emplea un detergente o agente de limpieza de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7.
- 5 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** la lipasa se encuentra en las aguas de lavado en una concentración del 0,00075 al 0,03 % en peso, preferentemente del 0,003 al 0,027 % en peso, y/o porque la proteasa se encuentra en las aguas de lavado en una concentración del 0,00075 al 0,03 % en peso, preferentemente del 0,003 al 0,027 % en peso.
- 10 11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado porque** se lleva a cabo a una temperatura entre 10 °C y 50 °C, preferentemente entre 10 °C y 40 °C y de manera especialmente preferente entre 20 °C y 40 °C.
12. Uso de una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 en al menos el 80 % y que en la posición 99 en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta el aminoácido ácido glutámico (E), para la provisión de una actividad proteolítica en un detergente o agente de limpieza líquido, que comprende una lipasa.
- 15 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado porque** la proteasa en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta además al menos uno de los siguientes aminoácidos:
- (a) treonina en la posición 3 (3T),
 - (b) isoleucina en la posición 4 (4I),
 - (c) alanina, treonina o arginina en la posición 61 (61A, 61T o 61 R),
 - 20 (d) ácido aspártico 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 aspártico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211G),
 - 25 (i) combinaciones de los aminoácidos (a) a (h).
14. Uso de una proteasa, que se selecciona del grupo que consiste en
- a. proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 2;
 - b. proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos modificada en al menos una posición con respecto a la SEQ ID NO. 2, seleccionándose la modificación en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 del grupo
 - 30 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 61 R),
 - iv. ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 154 (154D o 154E),
 - 35 v. prolina en la posición 188 (188P),
 - vi. metionina en la posición 193 (193M),
 - vii. isoleucina en la posición 199 (199I),
 - viii. ácido aspártico, ácido glutámico o glicina en la posición 211 (211 D, 211 E o 211 G),
 - 40 ix. combinaciones de los aminoácidos (i) a (viii);
- para la provisión de una actividad proteolítica en un detergente o agente de limpieza líquido, que comprende una lipasa.