

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 419 234**

(51) Int. Cl.:
C11D 3/386 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2007 PCT/EP2007/060631**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2008 WO08040818**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2007 E 07821004 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **23.11.2016 EP 2074205**

(54) Título: **Composiciones detergentes y uso de combinaciones de enzimas en las mismas**

(30) Prioridad:

06.10.2006 DK 200601307

(73) Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
KROGSHÖJVEJ 36
2880 BAGSVARD, DK**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
05.05.2017

(72) Inventor/es:

**MIKKELSEN, MIKAEL;
RYOM, NIELS, MUNK;
LADEFØGED, CLAUS y
FRIIS-JENSEN, SANDRA**

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

DESCRIPCIÓN

Composiciones detergentes y uso de combinaciones de enzimas en las mismas.

- 5 [0001] La presente invención se refiere a composiciones detergentes tipo gel o líquidas acuosas que comprenden combinaciones específicas de enzimas. Las composiciones detergentes pueden comprender además una combinación de ácido bórico o un compuesto de boro capaz de formar ácido bórico en la composición, un compuesto polihidroxi, preferiblemente propanodiol, y un nivel relativamente alto de ión calcio para estabilizar una combinación seleccionada de una enzima proteasa y otras enzimas. La invención también se refiere a un proceso para aumentar la estabilidad de
10 las enzimas no proteasas en combinación de una enzima proteasa con otras enzimas en una composición detergente en gel o líquida. La invención además se refiere al uso de enzimas proteasas específicas en composiciones detergentes

Estado de la técnica

- 15 [0002] Proteasas han sido usadas en composiciones detergentes durante aproximadamente 50 años y varias de estas proteasas han sido desarrolladas en los últimos 10 años por ingeniería de proteínas precursoras.

[0003] La proteasa precursora más exitosa en el mercado es subtilisina 309 - o Savinase®. Ingeniería de proteínas de Savinase fue primero descrita en 1989 en WO 89/06279. Posteriormente un gran número de solicitudes de patente referentes a la ingeniería de proteínas de Savinase ha sido solicitado por el solicitante y otras compañías, tales como Genencor international, Inc., Procter & Gamble, Unilever NV, etc. También, varias variantes de Savinase han sido comercializadas por Novozymes A/S y Genencor international, Inc.

- 25 [0004] La variante específica de Savinase comprendiendo las modificaciones Y167A+R170S+A194P fue descrita en WO 98/20115. En la presente solicitud hemos designado esta variante como subtilisina KL.

[0005] Composiciones detergentes en gel y líquidas acuosas que contienen enzimas, incluyendo proteasas, se conocen en la técnica. El mayor problema encontrado con tales composiciones es el de asegurar una estabilidad de almacenamiento suficiente de las enzimas en las composiciones. Es particularmente difícil estabilizar amilasas en presencia de proteasas, que pueden degradar fácilmente amilasas en composiciones detergentes en gel o líquidas acuosas pero también otras enzimas, tales como lipasas, celulasas, etc. son frecuentemente degradadas por las proteasas.

- 35 [0006] Amilasas de alto nivel alcalino tales como alfa amilasas son descritas en la especificación británica No. 1,296,839. El uso de un sistema estabilizador de enzimas que comprende una mezcla de ácido bórico o un borato de metal alcalino con ión calcio, y preferiblemente con un poliol, se describe en la patente EEUU 4,537,706, Severson. Ciertas α-amilasas que proporcionan limpieza y eliminación de manchas mejoradas están descritas en WO97/32961, Baeck et al., y en WO 96/23873 y patente EEUU 6,093,562.

- 40 [0007] US2003/180933 describe composiciones detergentes en gel o líquidas que comprenden una variante de subtilisina comprendiendo las mutaciones A167A + R170S + A194P en combinación con otras enzimas.

Descripción de la invención

- 45 [0008] La presente invención se refiere a una composición líquida o en gel que comprende subtilisina KL y/o sus variantes en combinación con al menos una lipasa, amilasa, celulasa o, mananasa, donde la proporción en peso entre el contenido de subtilisina KL o sus variantes al contenido de lipasa, amilasa, celulasa o mananasa es de 0,001 a 100, preferiblemente de 0,01 a 10, especialmente de 0,5 a 5, especialmente de 1 a 3, donde la variante de subtilisina KL es una del grupo definido en la reivindicación 1. En una forma de realización particular el contenido de subtilisina KL o sus variantes es de 0,001 a 5 % en peso y si están presentes el contenido de cada una de la siguiente lipasa, amilasa, celulasa, o mananasa, es del 0,001 al 5 % en peso.

[0009] Otra forma de realización de la invención se refiere al uso de subtilisina KL o sus variantes en combinación con al menos una, lipasa, amilasa, celulasa o mananasa, para la preparación de composiciones detergentes tipo gel o líquidas acuosas con estabilidad mejorada de las enzimas no proteasas, donde la variante de subtilisina KL es una del grupo definido en la reivindicación 6.

- 55 [0010] Otra forma de realización de la invención se refiere a un proceso para aumentar la estabilidad de las enzimas no proteasas en combinación de una enzima proteasa con otras enzimas en una composición detergente en gel o líquida que comprende una proteasa y al menos una enzima no proteasa, donde la composición detergente en gel o líquida es preparada usando la subtilisina KL o una variante de la misma como la enzima proteasa y donde al menos una enzima no proteasa es seleccionada entre lipasa, amilasa, celulasa o mananasa y donde la variante de subtilisina KL es una del grupo definido en la reivindicación 7.

- 65 [0011] En una forma de realización particular de la invención concierne

- [0012] Las amilasas para ser usadas en las composiciones detergentes de la invención son la amilasa de B. licheniformis y otras amilasas, tales como aquellas descritas en WO 2001/066712, WO 2006/002643, WO 2000/60060.
- 5 [0013] Las celulasas para ser usadas en las composiciones detergentes de la invención son tales como aquellas descritas en WO 1995/024471, WO 91/17244, WO 2002/099091.
- [0014] Las lipasas para ser usadas en las composiciones detergentes de la invención son tales como aquellas descritas en WO 2000/060063.
- 10 [0015] Las mananasas para ser usadas en las composiciones detergentes de la invención son tales como aquellas descritas en WO 99/64619, por ejemplo SEQ ID nº: 2.
- [0016] La endoglucanasa para ser usada en las composiciones detergentes de la invención son tales como aquellas descritas en WO 91/17244
- 15 [0017] Las variantes de subtilisina KL de la presente invención son tales como aquellas indicadas en la Tabla 1, que también están indicadas en la WO 98/20115:

Tabla 1

Mutaciones en la subtilisina KL
Ninguna
*36D
P14T
N18K
N62D
V83L
A133P
E136Q
E136R
E136K
N140R
N140K
S141E
S141N
S141Y
S141R
T143R
T143K
S153R
S156R
A160R
S162R
S162K
I165R
I165K
Y171R
Y171K
A172R
A172K
A174R
N173R
N173K
A174K
N76D
Y176R
Y176K
A187R
A187K
S188P
S190P
Q191R
Y192R
Y192R
Q191P

Y192A
Y192P
D197N
D197R
D197E
D197K
D197G
A228V
A230V
T260R
T260K
G264R
G264K
S265T
S265R
S265K
N218S
M222S
M222A
M222G
M222T
M222V
M222S
N243R
V244R
N248R
K251R
N252R
N261R
Combinaciones
S9R+A15T+T22A+N218S+K251R
S9R+A15T+T22A+V841+N218S
V30I+V139L+N218S
V84I+V139L+N218S
N76D+N218S
N76D+A228V
N76D+A230V
N76D+N218S+A230V
N76D+A228V+A230V
N218S+R247Q
N218S+R247H
N218S+R247E
N218S+R247K
D181N+N218S
N218S+A230V
K251R+S265K
P14T+N18K
T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH+*275dH=
T274H+R275HHHH
T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH=T274H+R275HHHH
S87N+S101G,V104N
*36D+N76D+H120D+G195E+K235L
A133P+M222S
Inserciones y combinaciones con las mismas
*96aA
*96aA+A98T
*96aA+A133P
*96aA+A98T+A133P
*96aA+A98T+N218S
*97aP+A98T+N218S
*98aT,
*98aT+S99N+N218S
G97D+*98aT+N218S

*99aE=S99SE
*99aD=S99SD
*99aD+M222S=S99SD+M222S
N76D+s99A+*99aE=N76D+S99AE
N76D+*99aD+A230V=N76D+S99SD+A230V
S99A+*99aD=S99AD
S99A+*99aD+M222S=S99AD+M222S
S99A+*99aD+N218S=S99AD+N218S
S99A+*99aE+A230V=S99AE+A230V
A228V+A230V
*130aL+P194A

- [0018] Se ha descubierto sorprendentemente que la subtilisina KL y sus variantes anteriores muestran una compatibilidad destacable para otras enzimas usadas en composiciones detergentes líquidas tales como lipasas, amilasas, celulasas, peroxidases/oxidasas y hemicelulasas. Esta propiedad produce un aumento sustancial en la actividad residual de estas enzimas en combinación con la subtilisina KL y sus variantes anteriores en comparación con la actividad residual en presencia de otras proteasas, incluso después de períodos largos de almacenamiento. Al fin y al cabo el resultado es un rendimiento mejorado de la composición detergente o que se pueden obtener resultados similares con cantidades reducidas de enzima
- 5 10 Nomenclatura y convenciones para designación de variantes
- [0019] Al describir las distintas variantes de la enzima subtilisina KL contempladas o producidas según la invención, las siguientes nomenclaturas y convenciones han sido adaptadas para facilidad de referencia: un marco de referencia es primero definido alineando la enzima progenitora con subtilisina BPN' (BASBPN).
- 15 15 [0020] La alineación se puede obtener por la rutina de GAP del paquete GCG versión 9.1 para numerar las variantes que usan los siguientes parámetros: penalización de creación de gap = 8 y penalización de extensión de gap = 8 y todos los demás parámetros mantenidos en sus valores por defecto.
- 20 20 [0021] Otro método es usar alineamientos reconocidos conocidos entre subtilasas, como la alineación indicada en WO 91/00345. En la mayoría de los casos las diferencias no serán de ninguna importancia.
- 25 25 [0022] Así varias delecciones e inserciones serán definidas en relación con BASBPN (SEQ ID NO.1). Para una descripción detallada de la nomenclatura de modificaciones introducidas en un polipéptido por manipulación genética nos referimos a WO 00/71691 página 7-12.
- 30 30 [0023] Numeración de posiciones/residuos de aminoácidos si no se menciona nada más la numeración de aminoácidos usada aquí corresponde a aquella de la secuencia de subtilasa BPN' (BASBPN). Para descripción adicional de la secuencia de BPN', véase Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737.
- 35 35 [0024] "SAVINASE®" Savinase® está comercializada por Novozymes A/S. Es la subtilisina 309 de *B. Lentus*.
- 40 40 [0025] Modificación(es) de una variante de subtilisina KL. El término "modificación(es)" usado aquí se define para incluir modificación química al igual que la manipulación genética del ADN que codifica la subtilisina KL. La(s) modificación(es) puede(n) ser sustitución(es) de la(s) cadena(s) lateral(es) de aminoácidos, sustitución(es), delección(es) y/o inserciones en o al aminoácido(s) de interés.
- 45 45 [0026] Variante de subtilasa. En el contexto de esta invención, el término variante de subtilasa o subtilasa mutada significa una subtilasa que ha sido producida por un organismo que está expresando un gen mutante derivado de un microorganismo progenitor que poseía un gen original o progenitor y que produjo una enzima progenitora correspondiente, el gen progenitor habiendo sido mutado para producir el gen mutante donde dicha proteasa de la subtilasa mutada se produce cuando se expresa en un huésped adecuado.
- 50 50 [0027] Secuencias de subtilasa homólogas. La homología entre dos secuencias de aminoácidos está en este contexto descrita por el parámetro "identidad". Para determinar el grado de identidad entre dos subtilasas la rutina GAP del paquete GCG versión 9.1 se puede aplicar (infra) usando los mismos ajustes. La producción a partir de la rutina es además de la alineación de aminoácidos el cálculo del "porcentaje de identidad" entre las dos secuencias. Basado en esta descripción es rutina para un experto en la técnica identificar subtilasas homólogas adecuadas, que se pueden modificar según la invención.
- [0028] Polinucleótido aislado. El término "aislado", cuando se aplica a un polinucleótido, denota que el polinucleótido ha sido eliminado de su ambiente genético natural y por tanto está libre de otras secuencias de codificación indeseadas o extrañas, y está en una forma adecuada para el uso dentro de sistemas de producción de proteínas creadas genéticamente. Tales moléculas aisladas son aquellas que son separadas de su entorno natural e incluyen ADNc y

clones genómicos. Moléculas de ADN aisladas de la presente invención están libres de otros genes con los cuales éstas están comúnmente asociadas, pero pueden incluir regiones 5' y 3' no traducidas de origen natural tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto en la materia (ver por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316:774-78,1985). El término "un polinucleótido aislado" puede ser denominado de forma alternativa "un polinucleótido clonado".

5 [0029] Proteína aislada. Cuando se aplica a una proteína, el término "aislado" indica que la proteína ha sido eliminada de su entorno nativo. En una forma preferida, la proteína aislada está sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas homólogas (es decir, "impurezas homólogas (véase más abajo)). Una proteína aislada tiene más del 10% de pureza, preferiblemente más del 20% de pureza, más preferiblemente más del 30% de pureza, según está determinado por SDS-PAGE. Además se prefiere proporcionar la proteína en una forma altamente purificada, es decir, más del 40% pureza, más del 60% de pureza, más del 80% de pureza, más preferiblemente más del 95% de pureza, y de la forma más preferible más del 99% de pureza, según está determinado por SDS-PAGE. El término "proteína aislada" puede ser denominado de forma alternativa "proteína purificada".

10 15 [0030] Impurezas homólogas. El término "impurezas homólogas" significa cualquier impureza (p. ej. otro polipéptido distinto de la subtilasa de la invención), que se origina de la célula homóloga de la cual se obtiene originalmente la subtilasa de la invención.

20 25 [0031] Obtenido de. El término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente microbiana específica, significa que el polinucleótido y/o subtilasa producido por la fuente específica, o por una célula en la que un gen de la fuente ha sido insertado.

30 35 [0032] Sustrato. El término "sustrato" usado en conexión con un sustrato para una proteasa debería ser interpretado en su forma más general como que comprende un compuesto que contiene al menos un enlace peptídico (amida) susceptible de hidrólisis por una proteasa de subtilisina.

[0033] Producto. El término "producto" usado en conexión con un producto derivado de una reacción enzimática de 30 35 proteasa debería, en el contexto de la presente invención, ser interpretado para incluir los productos de una reacción de hidrólisis que implican una proteasa de subtilasa. Un producto puede ser el sustrato en una reacción de hidrólisis posterior.

40 [0034] Rendimiento de lavado. En el presente contexto el término "rendimiento de lavado" se usa como una capacidad 35 enzimática para eliminar cepas proteináceas u orgánicas presentes en el objeto que debe ser limpiado durante por ejemplo el lavado o limpieza de superficies duras.

[0035] La composición detergente de la invención puede por ejemplo ser formulada como una composición detergente para 40 45 ropa a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo para el lavado de la ropa adecuado para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante adicionada al enjuague, o ser formulada como una composición detergente para el uso en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o ser formulada para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

[0036] En general las propiedades de la(s) enzima(s) elegida(s) deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH-óptimo, compatibilidad con otros ingredientes no enzimáticos y enzimáticos, etc.), y la enzima(s) debería estar presente en cantidades eficaces.

50 [0037] Lipasas: lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes de proteínas creados genéticamente o modificados químicamente están incluidos. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo de una cepa SD 705 de *Pseudomonas* sp. (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), o una lipasa de *Bacillus* como se describe en WO 2000/060063.

55 [0038] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202. Enzimas lipasas usadas preferidas comercialmente incluyen Lipolase®, Lipolase Ultra® y Lipex® (Novozymes A/S).

60 65 [0039] Amilasas: amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes de proteínas creados genéticamente o químicamente modificados están incluidos. Amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*. Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, WO 2000/60060, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444. Amilasas comercialmente usadas son Duramyl®, Termamyl®, Stainzym®, Stainzyme Plus®, Stainzyme ultra®, Fungamyl® y BAN® (Novozymes A/S), RapidaseTM, PurastarTM y Purastar OxAmTM (de Genencor International Inc.).

- [0040] Celulasas: celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes creados genéticamente de proteínas o modificados químicamente están incluidos. Celulasas adecuadas incluyen celulasas del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259. Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas neutras o alcalinas con beneficios de cuidado del color y de mantenimiento de blancura. Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como los descritos en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299. Celulasas usadas comercialmente incluyen *Renozyme®*, *Celluzyme®*, *Celluclean®*, *Endolase®* y *Carezyme®* (Novozymes A/S), *Clazynase™*, y *Puradax HA™* (Genencor Int. Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).
- [0041] Peroxidases/oxidases: peroxidases/oxidases adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, fúngico o bacteriano. Mutantes creados genéticamente de proteínas o químicamente modificados son incluidos. Ejemplos de peroxidases útiles incluyen peroxidases de *Coprinus*, por ejemplo de *C. cinereus*, y sus variantes como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257. Peroxidases comercialmente usadas incluyen *Guardzyme™* (Novozymes A/S).
- [0042] Hemicelulasas: hemicelulasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes creados genéticamente de proteína o químicamente modificados están incluidos. Hemicelulasas adecuadas incluyen mananasa, liqueninasa, xilanasa, arabinasa, galactanasa, actetyl xilano esterasa, glucorunidasa, esterasa de ácido ferúlico, esterasa de ácido cumárico y arabinofuranosidasa como se describe en WO 95/35362. Mananasas adecuadas son descritas en WO 99/64619. Hemicelulasas comercialmente usadas incluyen *Mannaway®* (Novozymes A/S).
- [0043] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o por adición de un aditivo combinado comprendiendo todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular por ejemplo como un gel, un líquido, un lodo, etc. Formulaciones de aditivo de detergente preferidas son líquidos, en particular líquidos estabilizados, o lodos.
- [0044] Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenoglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238.216.
- [0045] La composición detergente de la invención está en forma de un gel o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente contenido hasta 70 % de agua y 0-30 % de solvente orgánico, o no acuoso.
- [0046] La composición detergente comprende uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o zwitteriónicos y/o catiónicos. Los tensioactivos están típicamente presentes a un nivel del 0,1 % al 60% en peso.
- [0047] Cuando se incluye en la misma el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un surfactante aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato alcohólico, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido alfa-sulfo graso, ácido alquil- o alquenilsuccínico o jabón.
- [0048] Cuando se incluye en la misma el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de un surfactante no iónico tal como alcohol etoxilato, nonilfenol, etoxilato alquilpoliglicosido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido polihidroxi alquil graso, o derivados de N-acil/N-alquil glucosamina ("glucamidas").
- [0049] El detergente puede contener 0-65 % de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilenodiaminatetraacético, ácido diethlenetriaminopentaacético, ácido alquil- o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej. SKS-6 de Hoechst).
- [0050] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli (etilenglicol), poli(vinil alcohol), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinylimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.
- [0051] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de perácido tal como tetraacetiletienodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de por ejemplo el tipo amida, imida, o sulfona.
- [0052] La(s) enzima(s) de la composición detergente de la invención se puede(n) estabilizar usando agentes

estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenoglicol, dictilenoglicol, metilpropanodiol, o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenil borónico tal como ácido 4-formilfenil borónico o mono- o trietanolamina, y la composición se puede formular como se describe en por ejemplo WO 92/19709, WO 92/19708, US 5,972,873 o EP 5 0832174.

[0053] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como por ejemplo acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes supensores de suciedad, agentes antiredeposición de suciedad, tintes, bactericidas, 10 blanqueadores ópticos, hidrótopos, inhibidores de decoloración, o perfumes.

[0054] Es actualmente contemplado que en las composiciones detergentes cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, se puede adicionar en una cantidad correspondiente a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular 0,1-1 15 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.

[0055] Variaciones en condiciones regionales y locales, tales como dureza del agua y temperatura de lavado demandan 20 composiciones detergentes regionales. Los Ejemplos 1 de detergente proporcionan gamas para la composición de un detergente líquido.

Materiales y métodos

Enzimas

25 [0056] En los ejemplos a continuación las siguientes enzimas disponibles comerciales son usadas. Alcalase® y Savinase® se usan como estándares para comparación:

Nombre	Tipo de enzima	Derivado de o descrito en
Alcalase®	Proteasa, subtilisina Carlsberg	B. licheniformis
Savinase®	Proteasa, subtilisina 309	B. latus
Termamyl®	amilasa	B. licheniformis
Novozym 342®		H. Insolens
Amylase A	amilasa	La variante de amilasa D183*+G184*+R118K+N195F+R458K. WO 01/66712
Mannan A	Mananasa	WO 99/64619
Lipase A	Lipasa	variante T231 R+N233R de lipasa T. lanuginosus , WO00/60063
Celulase A	Celulasa	H. Insolens, WO 91/17244

También se usa la proteasa designada subtilisina KL y sus variantes. Subtilisina KL es una variante Y167A+R170S+A194P de Savinase (usando numeración de BPN')

Ensayos

Compatibilidad de proteasa:

35 [0057] La compatibilidad de proteasa de las enzimas se determina por preparación de las composiciones detergentes como se indica en cada Ejemplo y por medición de la actividad residual de las otras actividades enzimáticas después de los períodos indicados en los Ejemplos.

Actividad enzimática:

40 [0058] Actividades enzimáticas son medidas usando los bien conocidos métodos estándares reconocidos .

Composiciones detergentes

45 [0059] Las composiciones de detergente usadas en los ejemplos son bien un detergente modelo según las composiciones proporcionadas a continuación o detergentes líquidos comerciales para ropa por ejemplo Tide, Era, Gain, Cheer, Wisk, All, Purex, Arm & Hammer, Sun, Great Value, Ariel, Persil, Total, Skip, Dash, Dixan, Ava o cualquier otra extensión de marca o versiones concentradas del detergente líquido. Si el detergente para ropa comercial usado 50 comprende enzimas éstas son inactivadas antes del uso calentando el detergente en un horno de microondas a 85°C durante 5 minutos. Composición A detergente modelo - ejemplo detergente 1

Grupo	Subnombre	Contenido
Tensioactivos		5-60%
	Sulfonatos	0-30%
	Sulfatos	0-15%
	Jabones	0-15%
	No iónicos	0-15%
	Catiónicos	0-15%
	Óxidos de amina	0-10%
	FAGA	0-10%
Solventes		5-35%
	Etanol	0-10%
	MPG - monopropilenoglicol	0-20%
	DEG - Dietilenoglicol	0-15%
	MPD - metilpropanodiol	0-15%
	MEA - monoetanolamina	0-10%
	TEA - trietanolamina	0-10%
	Hidrótopos como SXS, SCS, etc	
	Cumeno sulfonato de sodio	
	Xileno sulfonatos de sodio	0-10%
	Otros solventes	0-10%
Constructores		0-20%
	Citrato de Na	0-15%
	Otros constructores	0-15%
Otros		0-20%
	Polímeros	0-5%
	Enzimas	0-10%
	Ácido bórico y sus derivados	0-5%
Constructores		0-20%
	Reguladores de espuma	0-10%
	Otros	0-10%
Se añade agua hasta el equilibrio del 100%		

Ejemplo 1

- 5 [0060] A un detergente líquido comercial para ropa se le añadieron proteasas comerciales, amilasas, lipasa, y celulasas según están catalogadas a continuación (si el detergente ya contiene enzimas entonces éstas se pueden inactivar calentando el detergente en un horno microondas hasta 85°C durante 5 minutos). Cuando la subtilisina KL fue usada en comparación con proteasa comercial, la misma cantidad de unidades de actividad fue usada.
- 10 [0061] La estabilidad de las enzimas según se determina por % de actividad enzimática residual después del almacenamiento a 20°C durante 1, 2 y 4 semanas se muestra en tabla 2-5.

[0062] Condiciones de almacenamiento: 20°C durante 1, 2, 4 semanas en los vasos de vidrio cerrados

15

Tabla 2 Actividad de amilasa residual

Semanas	1	2	3	4
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Termamyl 300L	93	92	89	87
Subtilisina KL				
0.3% Termamyl 300 L	96	98	95	92
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Amylase A 12L	34	16	10	7
Subtilisina KL				
0.3% Amylase A 12 L	90	86	82	78

Tabla 3 Actividad de lipasa residual

Semanas	1	2	3	4
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Lipase A 100 L	12	11	8	9
Subtilisina KL				
0.3% Lipase A 100 L	72	54	46	38

Tabla 4 Actividad de celulasa residual

Semanas	1	2	3	4
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Celulase A 5000 L		85	76	68
Subtilisina KL				
0.3% Celulase A 5000 L		99	87	88

Tabla 5 Actividad de proteasa residual

Semanas	1	2	3	4
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Celulase A 5000 L	86	64	57	50
Subtilisina KL				
0.3% Celulase A 5000 L	84	74	65	56

- 5 [0063] Como se puede observar arriba la compatibilidad enzimática de la presente invención es claramente mejorada cuando la subtilisina KL se selecciona como la proteasa en vez de Alcalase 2.5L. La estabilidad enzimática de celulasa A 5000L, Lipase A 100L, Termamyl 300L y Amilasa A 12L después 1, 2, 3 y 4 semanas a 30°C es claramente mejorada si la subtilisina KL es la proteasa. La proteasa de subtilisina KL es tan estable como la proteasa de referencia, Alcalase 2.5L, usada.

10

Ejemplo 2

- [0064] Al detergente líquido comercial para ropa de Ejemplo 1 se le añadieron proteasas comerciales, amilasas, lipasa, y celulasas como se cataloga a continuación (si el detergente ya contiene enzimas luego éstas son inactivadas 15 calentando el detergente en un microhorno hasta 85°C durante 5 minutos). Cuando la subtilisina KL fue usada en comparación con proteasa comercial, la misma cantidad de unidades de actividad fue usada.

- [0065] La estabilidad de las enzimas como determinado por % de actividad enzimática residual después 20 almacenamiento a 30°C durante 1, 2 y 4 semanas se muestra en la tabla 6-9.

Tabla 6 Actividad de amilasa residual

Semanas	1	2	3	4
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Termamyl 300L	85	78	71	66
Subtilisina KL				
0.3% Termamyl 300 L	93	87	83	73
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Amylase A 12L	10	5	4	4
Subtilisina KL				
0.3% Amylase A 12 L	81	74	63	59

Tabla 7 Actividad de lipasa residual

Semanas	1	2	3	4
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Lipase A 100 L	9	8	5	6
Subtilisina KL				
0.3% Lipase A 100 L	35	17	11	6

Tabla 8 Actividad de celulasa residual

Semanas	1	2	3	4
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L				
0.3% Celulase A 5000 L	47	24	16	13
Subtilisina KL				
0.3% Celulase A 5000 L	67	66	55	55

Tabla 9 Actividad de proteasa residual

Semanas	1	2	3	4
0.5% Alcalase Ultra 2.5 L	57	36	29	21
Subtilisina KL	55	36	24	16

- 30 [0066] Como se puede observar arriba la compatibilidad enzimática de la presente invención es claramente mejorada cuando la subtilisina KL se selecciona como la proteasa en vez de Alcalase 2.5L. La estabilidad enzimática de Cellulase A 5000L, Lipase A 100L, Termamyl 300L y Amylase A 12L después de 1, 2, 3 y 4 semanas a 30°C es claramente mejorada si subtilisina KL se selecciona como proteasa. La proteasa subtilisina KL es justo tan estable como la

proteasa de referencia, Alcalase 2.5L, usada.

Ejemplo 3

- 5 [0067] A un detergente líquido comercial para ropa se le añadieron proteasas comerciales, amilasas, y lipasas según está catalogado a continuación (si el detergente ya contiene enzimas entonces éstas se pueden inactivar calentando el detergente en un microondas hasta 85°C durante 5 minutos). Cuando la subtilisina KL fue usada en comparación con proteasa comercial, la misma cantidad de unidades de actividad fue usada.
- 10 [0068] La estabilidad de las enzimas según está determinado por % de actividad enzimática residual después del almacenamiento a 30°C durante 1, 2, 4 y 8 semanas se muestra en tabla 10-11.

Tabla 10 Actividad de amilasa residual

Semanas	1	2	4	8
0.4% Alcalase 2.5 L				
0.4% Amylase A 12 L	42	36	19	9
0.4% Savinase 16 L				
0.4% Amylase A 12 L	48	41	24	9
Subtilisina KL				
0.4% Amylase A	77	73	63	42
0.4% Amylase A 12 L				
(sin proteasa)	88	89	82	62

15 Tabla 11 Actividad de lipasa residual

Semanas	1	2
0.4% Alcalase 2.5 L		
0.4% Lipase A 100 L	9	8
Subtilisina KL		
0.4% Lipase A 100 L	33	22
0.4% Lipase A 100 L		
(sin proteasa)	86	81

[0069] Como se puede observar arriba la compatibilidad enzimática de la presente invención es claramente mejorada cuando la subtilisina KL se selecciona como la proteasa en vez de Savinase 16L y Alcalase 2.5L. La estabilidad enzimática de Lipase A 100L y Amylase A 12L después 2 y 8 semanas se mejora significativamente si se selecciona subtilisina KL como la proteasa preferida.

Ejemplo 4

[0070] Un detergente líquido con la siguiente formulación como se muestra en la tabla 13 es preparada.

25 Tabla 13 Formulación de detergente

Subnombre	Contenido
Cloruro de calcio	0,1%
LAS-sal de sodio	11. 81%
Ácido sebálico de soja - sal de sodio	5,94%
Propilenoglicol	5,05%
C-13-Oxoalcohol etoxilato, 8EO	9,45%
Fosfonato	1,00%
Ácido sebálico de coco - sal de trietanolamina	6,50%
Citrato sódico	1,00%
Etanol	4,63%
Opacificante	0,12%
Perfume	0,35%
Color	-
Agua hasta 100%	

Enzimas usadas

30 [0071]

Proteasa:	Savinase 16L
	Alcalase 2,5L
	Subtilisina KL
	Subtilisina KL M222S
	Subtilisina KL *36D
	Subtilisina KL N76D+S99SE+A230V
	Subtilisina KL S162R
	Subtilisina KL S99SE+N76D
	Subtilisina KL N76D
	Subtilisina KL A228V
	Subtilisina KL A230V
	Subtilisina KL A228V+A230V
Lipasa:	Lipase A 100L
Amilasa:	Termamyl 300L
Manasa:	Mannan A4,0L

Configuración de prueba I

5 [0072]

Adición de enzimas:	I) Savinase 16L (0,17mg EP/g)
	II) Subtilisina KL (0,17mg EP/g)
	III) Alcalase 2,5L(0,17mg EP/g)
Amilasa:	Termamyl 300L (0,4%)

Las cantidades de proteasa se dan en la proteína enzimática (activa) por gramos [EP/g].

10 [0073] Las formulaciones detergentes se almacenan en 2, y 4 semanas a 30°C en vasos de vidrio cerrados. Después del almacenamiento, las actividades de la proteasa residual y de amilasa son determinadas.

Tabla 14 % de actividad de proteasa residual

Semanas	2	4
0,17mg Savinase 16L + 0,4% Termamyl 300L	21	15
0,17mg Alcalase 2,5L + 0,4% Termamyl 300L	23	16
0,17mg Subtilisina KL + 0,4% Termamyl 300L	16	10

15

Tabla 15 % de actividad de amilasa residual

Semanas	2	4
0,17mg Savinase 16L + 0,4% Termamyl 300L	90	92
0,17mg Alcalase 2,5L + 0,4% Termamyl 300L	94	95
0,17mg Subtilisina KL + 0,4% Termamyl 300L	97	97

Configuración de prueba II

[0074]

20

Adición de enzimas:	I) Savinase 16L (0,07mg EP/g)
	II) Subtilisina KL (0,07mg EP/g)
	III) Alcalase 2,5L (0,07mg EP/g)
	IV) Subtilisina 2,5KL M222S (0,07mg EP/g)
	V) Subtilisina 2,5KL *36D (0,07mg EP/g)
	VI) Subtilisina KL N76D+S99SE, A230V
Lipasa:	Lipase A 100L (0,2%)
Amilasa:	Termamyl 300L (0,2%)
Manasa:	Mannan A 4,0L (0,2%)

[0075] Las formulaciones detergentes se almacenan en 2, y 4 semanas a 30°C en vasos de vidrio cerrados. Después del almacenamiento las actividades de la proteasa residual, lipasa (Lip.), manasa (Man.) y amilasa (Ter.) son determinadas.

25

Tabla 16 % de actividad de proteasa residual

Semanas	2	4
0,07mg Savinase 16L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	21	13
0,07mg Alcalase 2,5L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	24	22
0,07mg Subtilisina KL 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	18	13
0,07mg Subtilisina KL M222S 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	50	50
0,07mg Subtilisina KL *36D 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	59	19
0,07mg Subtilisina KL N76D+S99SE+A230V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	84	77

Tabla 17 % de actividad de amilasa residual

Semanas	2	4
0,07mg Savinase 16L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	97	96
0,07mg Alcalase 2,5L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	87	89
0,07mg Subtilisina KL 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	97	97
0,07mg Subtilisina KL M222S 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	98	101
0,07mg Subtilisina KL *36D 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	97	98
0,07mg Subtilisina KL N76D+S99SE+A230V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	98	98

5

Tabla 18 % de actividad de lipasa residual

Semanas	2	4
0,07mg Savinase 16L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	5	5
0,07mg Alcalase 2,5L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	5	5
0,07mg Subtilisina KL 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	4	4
0,07mg Subtilisina KL M222S 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	20	15
0,07mg Subtilisina KL *36D 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	6	6
0,07mg Subtilisina KL N76D+S99SE+A230V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	22	17

Tabla 19 % de actividad de manasa residual

Semanas	2	4
0,07mg Savinase 16L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	38	25
0,07mg Alcalase 2,5L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	14	13
0,07mg de Subtilisina KL 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	62	48
0,07mg Subtilisina KL M222S 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	89	84
0,07mg Subtilisina KL *36D 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	63	54
0,07mg Subtilisina KL N76D+S99SE+A230V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	99	95

Configuración de prueba III

Adición de enzimas:	I) Savinase 16L (0,05mg EP/g det.)
	II) Subtilisina KL (0,05mg EP/g det.)
	III) Alcalase 2,5L (0,05mg EP/g det.)
	VII) Subtilisina 2,5KL S162R (0,05mg EP/g det.)
	VIII) Subtilisina KL S99SE+N76D (0,05mg EP/g det.)
	IX) Subtilisina KL N76D (0,05mg EP/g det.)
	X) Subtilisina KL A228V (0,05mg EP/g det.)
	XI) Subtilisina KL A230V (0,05mg EP/g det.)
	XII) Subtilisina KL A228V, A230V (0,05mg EP/g det.)
	EP = proteína enzimática
	det = detergente
Lipasa:	Lipase A 100L (0,2%)
Amilasa:	Termamyl 300L (0,2%)
Manasa:	Mannan A 4,0L (0,2%)

[0077] Las formulaciones detergentes se almacenan en 1, 2 y 3 semanas a 30°C en vasos de vidrio cerrados. Después del almacenamiento las actividades de proteasa residual, lipasa (Lip.), manasa (Man.) y amilasa (Ter.) son determinadas.

5

Tabla 20 % de actividad de proteasa residual

Semanas	1	2	3
0,05mg Savinase 16L			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	89	20	12
0,05mg Alcalase 2,5L			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	85	37	37
0,05mg Subtilisina KL			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	70	17	17
0,05mg Subtilisina KL S162R			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	45	12	12
0,05mg Subtilisina KL S99SE+N76D			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	75	77
0,05mg Subtilisina KL N76D			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	94	95	89
0,05mg Subtilisina KL A228V			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	85	83	78
0,05mg Subtilisina KL A230V			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	99	87	80
0,05mg Subtilisina KL A228V+A230V			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	98	89

Tabla 21 % de actividad de amilasa residual

Semanas	1	2	3
0,05mg Savinase 16L			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	98	96
0,05mg Alcalase 2,5L			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	96	97
0,05mg Subtilisina KL			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	98	97
0,05mg Subtilisina KL S162R			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	99	97	97
0,05mg Subtilisina KL S99SE+N76D			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	99	98	98
0,05mg Subtilisina KL N76D			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	100	100
0,05mg Subtilisinaa KL A228V			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	100	100
0,05mg Subtilisina KL A230V			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	100	100
0,05mg Subtilisina KL A228V+A230V			
0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	100	100	100

Tabla 22 % de actividad de lipasa residual

Semanas	1	2	3
0,05mg Savinase 16L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	30	5	5
0,05mg Alcalase 2,5L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	10	6	6
0,05mg Subtilisina KL 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	59	8	5
0,05mg Subtilisina KL S162R 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	82	14	6
0,05mg Subtilisina KL S99SE+N76D 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	81	15	20
0,05mg Subtilisina KL N76D 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	49	49	57
0,05mg Subtilisina KL A228V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	53	52	47
0,05mg Subtilisina KL A230V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	65	59	52
0,05mg Subtilisina KL A228V+A230V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	61	55	48

Tabla 23 % de actividad residual de Manasa

Semanas	1	2	3
0,05mg Savinase 16L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	93	44	27
0,05mg Alcalase 2,5L 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	81	29	24
0,05mg Subtilisina KL 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	98	71	58
0,05mg Subtilisina KL S162R 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	105	77	73
0,05mg Subtilisina KL S99SE+N76D 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	98	98	100
0,05mg Subtilisina KL N76D 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	89	96	90
0,05mg Subtilisina KL A228V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	95	96	92
0,05mg Subtilisina KL A230V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	107	90	89
0,05mg Subtilisina KL A228V+A230V 0,2% Ter., 0,2% Lip. y 0,2% Man.	97	88	84

5 Referencias citadas en la descripción

[0078] Esta lista de referencias citada por el solicitante solo es por conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. A pesar de que se ha tenido mucho cuidado en la compilación de las referencias, los errores u omisiones no pueden ser excluidos y la EPO renuncia a toda responsabilidad en este sentido.

10

Documentos de Patentes citados en la descripción

[0079]

- WO8906279A [0003]
- WO9820115A [0004] [0017]
- GB1296839A [0006]
- US4537706A [0006]
- WO9732961 [0006]
- WO9623873A [0006] [0039]
- US6093562A [0006]
- US2003180933A [0007]
- WO2001066712A [0012]
- WO2006002643A [0012]
- WO200060060A [0012] [0039]

20

- WO1995024471A **[0013]**
- WO9117244A **[0013] [0016] [0056]**
- WO2002099091A **[0013]**
- WO2000060063A **[0014] [0037]**
- 5 • WO9964619A **[0015] [0042] [0056]**
- WO9100345A **[0021]**
- WO0071691A **[0022]**
- WO9613580A **[0037]**
- WO9506720A **[0037]**
- 10 • WO9627002A **[0037]**
- WO9612012A **[0037]**
- WO9205249A **[0038]**
- WO9401541A **[0038]**
- EP407225A **[0038]**
- 15 • EP260105A **[0038]**
- WO9535381A **[0038]**
- WO9600292A **[0038]**
- WO9530744A **[0038]**
- WO9425578A **[0038]**
- 20 • WO9514783A **[0038]**
- WO9522615A **[0038]**
- WO9704079A **[0038]**
- WO9707202A **[0038]**
- WO9402597A **[0039]**
- 25 • WO9418314A **[0039]**
- WO9743424A **[0039]**
- US5648263A **[0040]**
- US5691178A **[0040]**
- US5776757A **[0040]**
- 30 • WO8909259A **[0040]**
- EP0531372A **[0040]**
- WO9611262A **[0040]**
- WO9629397A **[0040]**
- WO9808940A **[0040]**
- 35 • WO9407998A **[0040]**
- EP0531315A **[0040]**
- US5457046A **[0040]**
- US5686593A **[0040]**
- US5763254A **[0040]**
- 40 • WO9524471A **[0040]**
- WO9812307A **[0040]**
- DK9800299W **[0040]**
- WO9324618A **[0041]**
- WO9510602A **[0041]**
- 45 • WO9815257A **[0041]**
- WO9535362A **[0042]**
- EP238216A **[0044]**
- WO9219709A **[0052]**
- WO9219708A **[0052]**
- 50 • US5972873A **[0052]**
- EP0832174A **[0052]**
- WO0166712A **[0056]**
- WO0060063A **[0056]**

Literatura citada en la descripción, que no es de patentes

- SIEZEN et al. Protein Engng., 1991, vol. 4, 719-737 **[0023]**
- DYNANTIJAN Nature, 1985, vol. 316, 774-78 **[0028]**

REIVINDICACIONES

1. Composición de detergente en gel o líquida que comprende subtilisina KL o sus variantes en combinación con al menos una lipasa, amilasa, celulasa o mananasa, donde la proporción en peso entre el contenido de subtilisina KL o sus variantes al contenido de lipasa, amilasa, celulasa o mananasa es de 0,001 a 100, preferiblemente de 0,01 a 10, especialmente de 0,5 a 5, especialmente de 1 a 3 y donde la variante de subtilisina KL es una del grupo que consiste en
 5 *36D
 P14T
 10 N18K
 N62D
 V83L
 A133P
 E136Q
 15 E136R
 E136K
 N140R
 N140K
 S141E
 20 S141N
 S141Y
 S141R
 T143R
 T143K
 25 S153R
 S156R
 A160R
 S162R
 S162K
 30 I165R
 I165K
 Y171R
 Y171K
 A172R
 35 A172K
 A174R
 N173R
 N173K
 A174K
 40 N76D
 Y176R
 Y176K
 A187R
 A187K
 45 S188P
 S190P
 Q191R
 Y192R
 Y192R
 50 Q191P
 Y192A
 Y192P
 D197N
 D197R
 55 D197E
 D197K
 D197G
 A228V
 A230V
 60 T260R
 T260K
 G264R
 G264K
 S265T
 65 S265R
 S265K

N218S
 M222S
 M222A
 M222G
 5 M222T
 M222V
 M222S
 N243R
 V244R
 10 N248R
 K251R N252R
 N261R
 S9R+A15T+T22A+N218S+K251R
 S9R+A15T+T22A+V841+N218S
 15 V30I+V139L+N218S
 V84I+V139L+N218S
 N76D+N218S
 N76D+A228V
 N76D+A230V
 20 N76D+N218S+A230V
 N76D+A228V+A230V
 N218S+R247Q
 N218S+R247H
 N218S+R247E
 25 N218S+R247K
 D181N+N218S
 N218S+A230V
 K251R+S265K
 P14T+N18K
 30 T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH+*275dH=
 T274H+R275HHHHH
 T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH=T274H+R275HHHH
 S87N+S101G,V104N
 *36D+N76D+H120D+G195E+K235L
 35 A133P+M222S
 *96aA
 *96aA+A98T
 *96aA+A133P
 *96aA+A98T+A133P
 40 *96aA+A98T+N218S
 *97aP+A98T+N218S
 *98aT,
 *98aT+S99N+N218S
 G97D+*98aT+N218S
 45 *99aE=S99SE
 *99aD=S99SD
 *99aD+M222S=S99SD+M222S
 N76D+s99A+*99aE=N76D+S99AE
 N76D+*99aD+A230V=N76D+S99SD+A230V
 50 S99A+*99aD=S99AD
 S99A+*99aD+M222S=S99AD+M222S
 S99A+*99aD+N218S=S99AD+N218S
 S99A+*99aE+A230V=S99AE+A230V
 A228V+A230V
 55 *130aL+P194A

2. Composición detergente en gel o líquida según la reivindicación 1, donde la lipasa es seleccionada del grupo que comprende lipasas de *Humicola* (*Thermomyces*), por ejemplo de *H. lanuginosa* (*T. Lanuginosus*) o de *H. insolens*, lipasas de *Pseudomonas*, por ejemplo de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, cepa SD 705 de *Pseudomonas* sp., *P. wisconsinensis*, lipasas de *Bacillus*, por ejemplo de *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* o *B. pumilus* y sus variantes creadas químicamente o genéticamente.

3. Composición detergente en gel o líquida según la reivindicación 1 o 2, donde la amilasa es seleccionada del grupo que comprende amilasas de *Bacillus*, por ejemplo *B. licheniformis*.

65 4. Composición detergente en gel o líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la celulasa es

seleccionada del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycelioiphthora*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo de *Humicola insolens*, *Mycelioiphthora thermophila* y *Fusarium oxysporum*.

5. Composición detergente en gel o líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el contenido de
5 subtilisina KL o sus variantes es de 0,001 a 5 % en peso y si están presentes el contenido de cada una de las siguientes
lipasa, amilasa, celulasa o mananasa es de 0,001 a 5 % en peso.
6. Uso de subtilisina KL o sus variantes en combinación con al menos una lipasa, amilasa, celulasa o mananasa, para la
10 preparación de composiciones detergentes de tipo gel o líquidas acuosas con estabilidad mejorada de las enzimas no
proteasas
donde la variante de subtilisina KL es una del grupo que consiste en
*36D
P14T
N18K
15 N62D
V83L
A133P
E136Q
E136R
20 E136K
N140R
N140K
S141E
S141N
25 S141Y
S141R
T143R
T143K
S153R
30 S156R
A160R
S162R
S162K
I165R
35 I165K
Y171R
Y171 K
A172R
A172K
40 A174R
N173R
N173K
A174K
N76D
45 Y176R
Y176K
A187R
A187K
S188P
50 S190P
Q191R
Y192R
Y192R
Q191P
55 Y192A
Y192P
D197N
D197R
D197E
60 D197K
D197G
A228V
A230V
T260R
65 T260K
G264R

	G264K
	S265T
	S265R
	S265K
5	N218S
	M222S
	M222A
	M222G
	M222T
10	M222V
	M222S
	N243R
	V244R
	N248R
15	K251R
	N252R
	N261R
	S9R+A15T+T22A+N218S+K251R
	S9R+A15T+T22A+V841+N218S
20	V30I+V139L+N218S
	V84I+V139L+N218S
	N76D+N218S
	N76D+A228V
	N76D+A230V
25	N76D+N218S+A230V
	N76D+A228V+A230V
	N218S+R247Q
	N218S+R247H
	N218S+R247E
30	N218S+R247K
	D181N+N218S
	N218S+A230V
	K251R+S265K
	P14T+N18K
35	T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH+*275dH=
	T274H+R275HHHH
	T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH=T274H+R275HHHH
	S87N+S101G,V104N
	*36D+N76D+H120D+G195E+K235L
40	A133P+M222S
	*96aA
	*96aA+A98T
	*96aA+A133P
	*96aA+A98T+A133P
45	*96aA+A98T+N218S
	*97aP+A98T+N218S
	*98aT,
	*98aT+S99N+N218S
	G97D+*98aT+N218S
50	*99aE=S99SE
	*99aD=S99SD
	*99aD+M222S=S99SD+M222S
	N76D+s99A+*99aE=N76D+S99AE
	N76D+*99aD+A230V=N76D+S99SD+A230V
55	S99A+*99aD=S99AD
	S99A+*99aD+M222S=S99AD+M222S
	S99A+*99aD+N218S=S99AD+N218S
	S99A+*99aE+A230V=S99AE+A230V
	A228V+A230V
60	*130aL+P194A

7. Proceso para mejorar la estabilidad de las enzimas no proteasas en combinación de una enzima proteasa con otras enzimas en una composición detergente en gel o líquida que comprende una proteasa y al menos una enzima no proteasa, donde la composición detergente en gel o líquida es preparada usando la subtilisina KL o una variante de la misma como la enzima proteasa, donde al menos una enzima no proteasa es seleccionada entre lipasa, amilasa, celulasa o mananasa y donde la variante de subtilisina KL es una del grupo que consiste en.

ES 2 419 234 T5

	*36D
	P14T
	N18K
	N62D
5	V83L
	A133P
	E136Q
	E136R
	E136K
10	N140R
	N140K
	S141E
	S141N
	S141Y
15	S141R
	T143R
	T143K
	S153R
	S156R
20	A160R
	S162R
	S162K
	I165R
	I165K
25	Y171R
	Y171K
	A172R
	A172K
	A174R
30	N173R
	N173K
	A174K
	N76D
	Y176R
35	Y176K
	A187R
	A187K
	S188P
	S190P
40	Q191R
	Y192R
	Y192R
	Q191P
	Y192A
45	Y192P
	D197N
	D197R
	D197E
	D197K
50	D197G
	A228V
	A230V
	T260R
	T260K
55	G264R
	G264K
	S265T
	S265R
	S265K
60	N218S
	M222S
	M222A
	M222G
	M222T
65	M222V
	M222S

ES 2 419 234 T5

	N243R
	V244R
	N248R
	K251R
5	N252R
	N261 R
	S9R+A15T+T22A+N218S+K251R
	S9R+A15T+T22A+V841+N218S
	V30I+V139L+N218S
10	V84I+V139L+N218S
	N76D+N218S
	N76D+A228V
	N76D+A230V
	N76D+N218S+A230V
15	N76D+A228V+A230V
	N218S+R247Q
	N218S+R247H
	N218S+R247E
	N218S+R247K
20	D181N+N218S
	N218S+A230V
	K251R+S265K
	P14T+N18K
	T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH+*275dH=
25	T274H+R275HHHH
	T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH=T274H+R275HHHH
	S87N+S101G,V104N
	*36D+N76D+H120D+G195E+K235L
	A133P+M222S
30	*96aA
	*96aA+A98T
	*96aA+A133P
	*96aA+A98T+A133P
	*96aA+A98T+N218S
35	*97aP+A98T+N218S
	*98aT,
	*98aT+S99N+N218S
	G97D+*98aT+N218S
	*99aE=S99SE
40	*99aD=S99SD
	*99aD+M222S=S99SD+M222S
	N76D+s99A+*99aE=N76D+S99AE
	N76D+*99aD+A230V=N76D+S99SD+A230V
	S99A+*99aD=S99AD
45	S99A+*99aD+M222S=S99AD+M222S
	S99A+*99aD+N218S=S99AD+N218S
	S99A+*99aE+A230V=S99AE+A230V
	A228V+A230V
	*130aL+P194A

50