

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 210**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2017** **E 17208474 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025** **EP 3502244**

54 Título: **Composición detergente para lavavajillas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2025

73 Titular/es:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.00%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US

72 Inventor/es:

JACKSON, MICHELLE;
TARBIT, DAVID JOHN;
SOUTER, PHILIP FRANK;
PEREZ-PRAT DE VINUESA, EVA MARIA;
BABE, LILIA MARIA;
ESTELL, DAVID AARON;
GOEDEGEBUUR, FRITS;
MULDER, HARM JAN;
PRICELIUS, SINA;
DANKMEYER, LYDIA;
KAPER, THIJS y
ENGİN, HATICE BILLUR

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 023 210 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

Composición detergente para lavavajillas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al sector de los detergentes. En particular, se refiere a una composición detergente para lavavajillas exenta de fosfatos que comprende un sistema de agentes complejantes, una α -amilasa y una proteasa específica. La composición proporciona una limpieza mejorada en una pluralidad de condiciones en comparación con las composiciones que comprenden proteasas convencionales.

Antecedentes de la invención

Existe un deseo permanente de mejorar las prestaciones de las composiciones para lavavajillas y su perfil ambiental.

Debido a preocupaciones ambientales, el fosfato está siendo sustituido con creciente frecuencia por agentes complejantes biodegradables. Estos agentes complejantes son usualmente aditivos reforzantes de la detergencia fuertes y pueden afectar negativamente al rendimiento de las enzimas, en particular, los agentes complejantes fuertes pueden afectar negativamente a las proteasas al extraer los iones metálicos de calcio estructurales de las proteasas. Las proteasas pueden verse afectadas en el producto y/o durante el uso. Para los artículos más difíciles, los consumidores seleccionarían usualmente ciclos de lavado automático largos y calientes. En estos ciclos, típicamente, es difícil equilibrar la necesidad de un brillo excelente con la necesidad de un rendimiento excelente impulsada por el estrés que estos ciclos crean en las enzimas. Estas tensiones pueden agravarse adicionalmente por los altos niveles de blanqueadores.

Las composiciones para lavavajillas se pueden diseñar para que tengan un rendimiento óptimo en determinadas condiciones de uso, por ejemplo, una composición se puede diseñar para que tenga un rendimiento óptimo en un ciclo de agua dura; sin embargo, una composición que tiene un rendimiento óptimo en agua dura puede no tener un rendimiento óptimo en un ciclo de agua blanda y viceversa.

El objeto de la presente invención es proporcionar una composición para lavavajillas exenta de fosfatos que proporcione una mejor limpieza cuando se usa en agua dura y preferiblemente con diferentes durezas del agua y niveles de suciedad en la carga del lavavajillas.

La patente WO2016/205755A1 se refiere a serina proteasas del clado del *Bacillus gibsonii*.

La patente WO2017/192653A1 se refiere a una composición detergente para lavavajillas que comprende proteasa.

La patente WO2016/203064A2 se refiere a una composición detergente que comprende una variante de proteasa y alfa-amilasa o una variante de la misma.

La patente US2016/194583A1 se refiere a una composición detergente para lavavajillas exenta de fosfatos que contiene una partícula blanqueadora recubierta y una o más de una partícula de enzima o un aditivo reforzante de la detergencia a base de amino.

La patente WO2015/149641 se refiere a una composición detergente que comprende un ingrediente adyuvante al detergente y dos o más enzimas.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona una composición de limpieza para lavavajillas exenta de fosfatos que comprende:

(a) del 10 % al 50 % en peso de la composición de un sistema de agentes complejantes orgánicos que comprende al menos el 15 % en peso de la composición de ácido metilglicindiacético;

(b) una amilasa; y

(c) una proteasa en donde la proteasa es una variante que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende las mutaciones S039E-S099R-S126A-D127E-F128G.

Según el primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de limpieza para lavavajillas exenta de fosfato. La composición comprende un sistema de agentes complejantes y una proteasa específica. La composición presenta un rendimiento mejorado aun cuando se usa agua dura en el proceso de lavado en lavavajillas y el programa de lavado en lavavajillas usado es caliente (la temperatura de lavado es superior a 50 °C) y prolongado (el lavado principal dura más de 25 minutos) y la vajilla está muy sucia. Aun en estas condiciones de estrés muy elevado, la

composición de la invención proporciona muy buen brillo y limpieza, que incluye una muy buena eliminación de la suciedad a base de proteínas y almidón.

5 Según el segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para el lavado en lavavajillas que utiliza agua dura. Según el tercer aspecto de la invención, se proporciona el uso de la composición de la invención para el lavado en lavavajillas usando agua dura.

10 Los elementos de la composición de la invención descritos en relación con el primer aspecto de la invención se aplican, cambiando lo necesario, a los otros aspectos de la invención.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención abarca una composición de limpieza para lavavajillas. La composición está exenta de fosfatos y comprende un sistema de agentes complejantes que comprende un agente complejante fuerte, una proteasa y una amilasa. La composición proporciona con éxito un brillo excelente junto con una buena eliminación de la suciedad a base de proteínas y almidón, que incluye una buena eliminación de la suciedad mixta de proteínas y almidón. La composición proporciona una buena limpieza, en particular, de huevo, queso al horno y almidón. La invención también abarca métodos de lavado en lavavajillas con agua dura.

20 Por agua "dura" se entiende en la presente memoria agua que tiene una dureza de más de 205,4 mg/l (12 gpg (205,7 ppm)), preferiblemente más de 256,8 mg/l (15 gpg (257,1 ppm)) y más preferiblemente más de 325,2 mg/l (19 gpg (325,6 ppm)). El grano por galón (gpg) es una unidad de dureza del agua definida como 1 grano (64,8 miligramos) de carbonato de calcio disuelto en 1 galón estadounidense de agua (3,785412 l). Se traduce en 17,1 partes por millón (ppm) y 17,1181 mg/l.

25 Por ciclo "caliente" se entiende en la presente memoria un programa para lavado en lavavajillas en el que el ciclo principal se realiza a una temperatura superior a 50 °C, preferiblemente superior a 55 °C.

30 Por ciclo "largo" se entiende en la presente memoria un programa para lavado en lavavajillas en el que el ciclo principal tiene una duración de al menos 25, preferiblemente al menos 30 y más preferiblemente al menos 35 minutos.

La composición de la invención comprende una proteasa variante, las proteasas variantes tienen un porcentaje de identidad definido con respecto a una proteasa de referencia (proteasas de la SEQ ID NO: 1 a 10).

35 La proteasa de la composición de la invención se denomina a veces en la presente memoria "la proteasa de la invención". Las proteasas que tienen cualquiera de las secuencias con Id. de sec. n.º: 1 a 10 se denominan algunas veces en la presente memoria como "la proteasa de referencia".

40 La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos, se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia".

45 El término "variante" significa una proteasa que comprende una mutación, es decir, una sustitución, inserción y/o deleción, en una o más (p. ej., varias) posiciones con respecto a la proteasa de referencia. Una sustitución significa una sustitución del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una deleción significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir un aminoácido adyacente a, e inmediatamente después de, el aminoácido que ocupa una posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos un 60 %, preferiblemente al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 75 % y especialmente un 90 % de identidad con la proteasa de referencia.

50 En las realizaciones preferidas, la variante presenta al menos un 90 %, más preferiblemente al menos 92 % de identidad con la proteasa de la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 corresponde a la subtilisina Bgi02446 del clado de *B. gibsonii*. En otras realizaciones, la variante presenta al menos un 90 %, más preferiblemente al menos 92 % de identidad con la proteasa de la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 2 corresponde a la subtilisina de *B. lentus*. En otras realizaciones, la variante presenta al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 92 % de identidad con una de las proteasas de las secuencias SEQ ID NO: 3-10.

El término proteasa "natural" significa una proteasa expresada por un microorganismo existente de forma natural, tal como una bacteria, levadura, u hongo filamentoso encontrado en la naturaleza.

60 Terminología relacionada con las enzimas

Nomenclatura de las modificaciones en los aminoácidos

65 Para facilitar la referencia, se va a utilizar en la presente memoria la siguiente nomenclatura para describir las variantes enzimáticas: Aminoácido(s) original(es):posición(es):aminoácido(s) sustituido(s).

Según esta nomenclatura, por ejemplo, la sustitución de ácido glutámico por glicina en la posición 195 se muestra como G195E. Una delección de glicina en la misma posición se muestra como G195*, y la inserción de un residuo de aminoácido adicional tal como la lisina se muestra como G195GK. Cuando una enzima específica contiene una "delección" en comparación con otra enzima y se realiza una inserción en tal posición, esto se indica como *36D para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36. Las múltiples mutaciones están separadas por signos de adición, es decir: S99G+V102N, representando mutaciones en las posiciones 99 y 102 que sustituyen serina y valina por glicina y asparagina, respectivamente. Cuando el aminoácido en una posición (p. ej., 102) pueda estar sustituido por otro aminoácido seleccionado de un grupo de aminoácidos, p. ej., el grupo que consiste en N e I, esto se indicará mediante V102N,I.

En todos los casos, se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o en triplete aceptada por la IUPAC.

Numeración de los aminoácidos de la proteasa

La numeración utilizada en esta patente se refiere a las secuencias mostradas y no a la numeración BPN'.

Identidad de aminoácido

El grado de relación entre dos secuencias de aminoácidos se describe con el parámetro "identidad". Para los fines de la presente invención, la alineación de dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el programa Needle del paquete informático EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineación global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización por abertura de huecos es 10, y la penalización por extensión de huecos es 0,5.

El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de una enzima usada en la presente memoria ("secuencia de la invención") y una secuencia de aminoácidos diferente ("secuencia extraña") se calcula como el número de emparejamientos exactos en una alineación de ambas secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención", o la longitud de la "secuencia extraña", lo que sea más corto. El resultado se expresa como porcentaje de identidad. El emparejamiento exacto se produce cuando la "secuencia de la invención" y la "secuencia extraña" tienen residuos de aminoácidos idénticos situados en las mismas posiciones del solapamiento. La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia.

Los términos "compuesto basado en succinato" y "compuesto basado en ácido succínico" son intercambiables en la presente memoria.

Como se utiliza en la presente memoria, los artículos tales como "un" y "una" cuando se usan en una reivindicación, se refieren a uno o más de aquello que se reivindica o que se describe.

Salvo que se indique lo contrario, todos los niveles del componente o de la composición se refieren a una porción activa de ese componente o composición, y son excluyentes de impurezas, por ejemplo, disolventes residuales o subproductos, que puedan estar presentes en las fuentes comerciales de tales componentes o composiciones.

Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso, salvo que se indique lo contrario. Todos los porcentajes y relaciones se calculan basándose en la composición total salvo que se indique lo contrario.

La proteasa de la invención

La proteasa es una variante que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende las mutaciones S039E-S099R-S126A-D127E-F128G.

Las variantes de la presente invención tienen al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 92 % de identidad con la proteasa de la SEQ ID NO: 1.

La proteasa de la invención es

una variante que tiene al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 92 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende al menos una sustitución de aminoácido (utilizando la numeración de la SEQ ID NO: 1) seleccionada del grupo que consiste en S39E, S99R, S126A-D127E-F128G, N242D y mezclas de las mismas; y

Preferiblemente, la variante comprende al menos dos, más preferiblemente al menos tres sustituciones de aminoácidos (utilizando la numeración de la SEQ ID NO: 1) seleccionadas del grupo que consiste en S39E, S99R, S126A-D127E-F128G y N242D, y preferiblemente la variante comprende las siguientes sustituciones S39E, S99R, S126A-D127E-F128G y N242D.

ES 3 023 210 T3

Preferiblemente, la variante comprende además al menos una sustitución de aminoácidos (utilizando la numeración de la SEQ ID NO: 1) seleccionada entre P54T, X114Q y X114C, preferiblemente T114Q.

- 5 Preferiblemente, la variante comprende además al menos una y más preferiblemente al menos dos y más preferiblemente tres sustituciones de aminoácidos (utilizando la numeración de la SEQ ID NO: 1) seleccionadas del grupo que consiste en N74D; I80V, R, Y; N85S, C, D, I, K; E87D, C y M211L.

- 10 Preferiblemente, la variante comprende al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y dicha variante comprende además al menos una sustitución (utilizando la numeración de la SEQ ID NO: 1), preferiblemente al menos dos sustituciones y especialmente al menos tres sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en T3V, T9R, A15T, V66A, N74D, N85R, N97NE, N97AD, N97D/G, S99G/M, S101A, V102E/I, N116V/R, S126L, D127Q, F128A, G157S, Y161A, R164S, T188P, V199I, Q200C/E/I/K/T/V/W/L, Y203W, N212D, M216S/F, Q239R y T249R.

- 15 Las variantes especialmente preferidas para su uso en la composición de la invención se seleccionan del grupo que consiste en variantes que tienen al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 92 % de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y que comprenden sustituciones (utilizando la numeración de la SEQ ID NO: 1) seleccionadas del grupo que consiste en:

- 20 1)
- 2) S039E-I080V-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L
- 3) S039E-P054T-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L
- 25 4) S039E-I043V-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L
- 5) S039E-N042R-S099R-S126A-D127E-F128G
- 30 6) S039E-I080V-S099R-S126A-D127E-F128G
- 7) S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L
- 8) S039E-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L
- 35 9) S039E-T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L
- 10) S039E-A047V-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L
- 40 11) S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-Y203W
- 12) A037T-S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L
- 13) S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-V199I
- 45 14) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G
- 15) S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 50 16) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G
- 17) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G
- 18) S039E-I043V-S099R-S126A-D127E-F128G
- 55 19) S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-N253D
- 20) T009E-S039E-S099R-S126A-D127E-F128G
- 60 21) S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-S255W
- 22) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 23) A037T-S039E-I043V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 65 24) S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D

ES 3 023 210 T3

- 25) S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 5 26) S039E-T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G
- 27) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G
- 28) A037T-S039E-I043V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 10 29) A037T-S039E-I043V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 30) A037T-S039E-I043V-A047V-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 15 31) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 32) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-N242D
- 33) A037T-S039E-I043V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 20 34) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-N242D
- 35) S039E-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G
- 36) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 25 37) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 38)
- 30 39) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S126A-D127E-F128G-N242D
- 40)
- 41) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 35 42) S039E-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G
- 43)
- 40 44) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 45)
- 46) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 45 47) S039E-A047V-S099R-S126A-D127E-F128G
- 48) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 50 49) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G
- 50) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 51) S039E-P054T-S099R-S126A-D127E-F128G
- 55 52) A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
- 53) A037T-S039E-I043V-A047V-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 60 54) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
- 55)
- 65 56)

ES 3 023 210 T3

	57)	S039E-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G
	58)	
5	59)	
	60)	A037T-S039E-S099R-S126A-D127E-F128G
	61)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
10	62)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
	63)	
15	64)	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G
	65)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G
	66)	A037T-S039E-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
20	67)	
	68)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
25	69)	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S126A-D127E-F128G-N242D
	70)	A037T-S039E-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
	71)	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G
30	72)	A037T-S039E-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
	73)	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
35	74)	A037T-S039E-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
	75)	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-Q256E
	76)	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
40	77)	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-Q200L
	78)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
45	79)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
	80)	S039E-N074D-I080V-S099R-S126A-D127E-F128G
	81)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D
50	82)	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
	83)	
55	84)	
	85)	S039E-P054T-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G
	86)	S039E-A047V-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G
60	87)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D
	88)	S039E-N074D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G
65	89)	S039E-N074D-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G

90) A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D

91) S039E-N074D-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G

5 92) S039E-I043V-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G

93) S039E-T056Y-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G

10 94) S039E-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D

La proteasa de la invención funciona muy bien en composiciones exentas de fosfatos incluso cuando las composiciones se usan en agua blanda.

15 Los niveles preferidos de proteasa en la composición de la invención incluyen de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 5 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2 mg de proteasa activa por gramo de la composición.

Composición limpiadora para lavavajillas

20 La composición limpiadora para lavavajillas puede estar en cualquier forma física. Puede ser un polvo suelto, un gel o presentarse en forma de dosis unitaria. Preferiblemente, se encuentra en forma de dosis unitaria, las formas de dosis unitaria incluyen pastillas comprimidas y envases solubles en agua. La composición limpiadora para lavavajillas de la invención se presenta preferiblemente en forma de dosis unitaria y puede estar en cualquier forma física incluyendo sólida, líquida y en forma de gel. La composición de la invención es muy adecuada para su presentación en forma de
25 un envase multicompartimental, más en particular un envase multicompartimental que comprende compartimentos con composiciones en formas físicas diferentes, por ejemplo, un compartimento que comprende una composición en forma sólida y otro compartimento que comprende una composición en forma líquida. La composición está preferiblemente envuelta por una película soluble en agua tal como poli(alcohol vinílico). Son especialmente preferidas las composiciones en forma de dosis unitaria envueltas en una película de poli(alcohol vinílico) que tiene un espesor
30 de menos de 100 μm , preferiblemente de 20 a 90 μm . La composición detergente de la invención pesa de aproximadamente 8 a aproximadamente 25 gramos, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 gramos. Este intervalo de peso encaja cómodamente en un dispensador de lavavajillas. Aunque este intervalo supone una cantidad baja de detergente, el detergente se ha formulado de manera que proporcione todas las ventajas mencionadas anteriormente en la presente memoria.

35 La composición está preferiblemente exenta de fosfato. Por "exenta de fosfato" se entiende en la presente memoria que la composición comprende menos de 1 %, preferiblemente, menos de 0,1 % en peso de la composición de fosfato.

40 La composición de la invención está exenta de fosfatos y comprende un sistema de agentes complejantes que comprende un alto nivel de un agente complejante fuerte.

Sistema de agentes complejantes

45 Para los fines de esta invención, un "agente complejante" es un compuesto capaz de unir iones polivalentes tales como calcio, magnesio, plomo, cobre, zinc, cadmio, mercurio, manganeso, hierro, aluminio y otros iones polivalentes catiónicos para formar un complejo soluble en agua. El agente complejante tiene una constante de estabilidad logarítmica ($\log K$) para Ca^{2+} de al menos 3. La constante de estabilidad, $\log K$, se mide en una solución de fuerza iónica de 0,1, a una temperatura de 25 °C.

50 La composición de la invención comprende del 10 % al 50 % en peso de la composición de un sistema de agentes complejantes que comprende al menos el 10 % en peso de la composición de ácido metilglicindiacético (MGDA). El sistema de complejos puede comprender de forma adicional un agente complejante seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido glutámico-N,N-diacético (GLDA), ácido iminodisuccínico (IDS), carboximetil inulina, ácido L-aspartico, sal tetrasódica del ácido N,N-diacético (ASDA) y mezclas de los mismos. Para los fines de la
55 presente invención, el término "ácido", cuando se refiere a agentes complejantes, incluye el ácido y las sales del mismo.

La composición comprende al menos el 15 %, más preferiblemente del 20 % al 40 % en peso de la composición de MGDA, más preferiblemente la sal trisódica de MGDA. Las composiciones que comprenden este elevado nivel de
60 MGDA funcionan bien en agua dura y también en ciclos largos y/o calientes.

El sistema de agentes complejantes de la invención puede comprender además ácido cítrico.

Polímero dispersante

65

Puede utilizarse un polímero dispersante en cualquier cantidad adecuada de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 %, preferiblemente de 0,2 a aproximadamente 15 %, más preferiblemente de 0,3 a % en peso de la composición.

- 5 El polímero dispersante puede suspender el calcio o carbonato de calcio en un proceso de lavado en lavavajillas.

El polímero dispersante tiene una capacidad de unión al calcio comprendida en el intervalo entre 30 y 250 mg de Ca/g de polímero dispersante, preferiblemente entre 35 y 200 mg de Ca/g de polímero dispersante, más preferiblemente de 40 a 150 mg de Ca/g de polímero dispersante a 25 °C. Para determinar si un polímero es un polímero dispersante dentro del sentido de la invención, se realiza la siguiente determinación de la capacidad de unión al calcio según las siguientes instrucciones:

Método de ensayo de la capacidad de unión al calcio

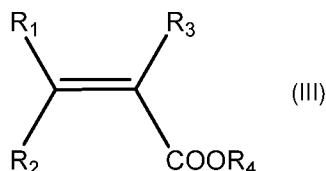
15 La capacidad de unión al calcio a la que se hace referencia en la presente memoria se determina mediante valoración volumétrica utilizando un medidor de pH/iones, tal como el medidor de sobremesa Mettler Toledo SevenMulti™ y un electrodo de combinación PerfectION™ comb Ca. Para medir la capacidad de unión se configura un dispositivo de calentamiento y agitación adecuado para vasos de precipitados o recipientes de tergotómetro a 25 °C, y el electrodo de iones con medidor se calibran según las instrucciones del fabricante. Las concentraciones normalizadas para calibrar el electrodo deben comprender la concentración de ensayo y deberán medirse a 25 °C. Se prepara una solución madre de 1000 mg/g de Ca añadiendo 3,67 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1 l de agua desionizada, luego se realizan diluciones para preparar tres soluciones de trabajo de 100 ml cada una, que comprenden, respectivamente, concentraciones de 100 mg/g, 10 mg/g, y 1 mg/g de calcio. La solución de trabajo de 100 mg de Ca/g se utiliza como concentración inicial durante la valoración volumétrica, que se lleva a cabo a 25 °C. La fuerza iónica de cada solución de trabajo se ajusta añadiendo 2,5 g/l de NaCl a cada una. Los 100 ml de la solución de trabajo de 100 mg de Ca/g se calientan y agitan hasta que se alcanzan 25 °C. La lectura inicial de la concentración de ion calcio se realiza cuando la solución alcanza 25 °C, utilizando el electrodo de ion. Después se añade el polímero de ensayo de forma incremental a la solución de trabajo de calcio (a intervalos de 0,01 g/l) y se mide tras 5 minutos de agitación tras de cada adición incremental. La valoración volumétrica se detiene cuando la solución alcanza 1 mg/g de calcio. El procedimiento de valoración volumétrica se repite con las dos soluciones de trabajo de concentración de calcio restantes. La capacidad de unión del polímero de ensayo se calcula como la pendiente lineal de las concentraciones de calcio medidas contra los gramos/l de polímero de ensayo añadido.

El polímero dispersante tiene, preferiblemente, una carga neta negativa cuando se disuelve en una solución acuosa con un pH mayor de 6.

El polímero dispersante puede también tener ésteres o amidas carboxílicos sulfonados, para aumentar la carga negativa a pH menor y mejorar sus propiedades dispersantes en agua dura. Los polímeros dispersantes preferidos son polímeros sulfonados/carboxilados, es decir, polímero que comprende tanto monómeros sulfonados como monómeros carboxilados.

Preferiblemente, los polímeros dispersantes son derivados sulfonados de ácidos policarboxílicos y pueden comprender dos, tres, cuatro o más unidades monoméricas diferentes. Los copolímeros preferidos contienen:

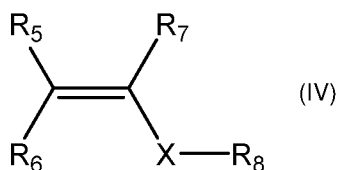
- 45 Al menos una unidad estructural derivada de un monómero de ácido carboxílico que tiene la fórmula general (III):



en donde R_1 a R_3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, grupos alquilo saturados lineales o ramificados que tengan de 2 a 12 átomos de carbono, grupos alqueno lineales o ramificados monoinsaturados o poliinsaturados que tengan de 2 a 12 átomos de carbono, grupos alquilo o alqueno sustituidos, como se ha mencionado anteriormente, por $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$, o $-\text{COOH}$, o COOR_4 , donde R_4 se selecciona de hidrógeno, metal alcalino o un grupo alquilo o alqueno lineal o ramificado saturado o insaturado con de 2 a 12 átomos de carbono;

Los monómeros de ácido carboxílico preferidos incluyen uno o más de lo siguientes: ácido acrílico, ácido maleico, anhídrido maleico, ácido itacónico, ácido citracónico, ácido 2-fenilacrílico, ácido cinámico, ácido crotónico, ácido fumárico, ácido metacrílico, ácido 2-etilacrílico, ácido metilenmalónico, o ácido sórbico. Los más preferidos son los ácidos acrílico y metacrílico.

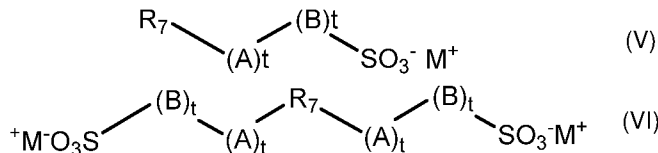
Opcionalmente, una o más unidades estructurales derivadas de al menos un monómero no iónico que tiene la fórmula general (IV):



En donde R₅ a R₇ se seleccionan independientemente de grupos hidrógeno, metilo, fenilo o hidroxialquilo, que contengan de 1 a 6 átomos de carbono, y pueden formar parte de una estructura cíclica, X es un grupo separador opcionalmente presente que se selecciona de -CH₂-, -COO-, -CONH- o -CONR₈-, y R₈ se selecciona de radicales alquilo saturados lineales o ramificados que tengan de 1 a 22 átomos de carbono o radicales insaturados, preferiblemente aromáticos, que tengan de 6 a 22 átomos de carbono.

Los monómeros no iónicos preferidos incluyen uno o más de los siguientes: buteno, isobuteno, penteno, 2-metilpent-1-eno, 3-metilpent-1-eno, 2,4,4-trimetilpent-1-eno, 2,4,4-trimetilpent-2-eno, ciclopenteno, metilciclopenteno, 2-metil-3-metil-ciclopenteno, hexeno, 2,3-dimetilhex-1-eno, 2,4-dimetilhex-1-eno, 2,5-dimetilhex-1-eno, 3,5-dimetilhex-1-eno, 4,4-dimetilhex-1-eno, ciclohexeno, metilciclohexeno, ciclohepteno, alfa olefinas que tengan 10 o más átomos de carbono, tales como dec-1-eno, dodec-1-eno, hexadec-1-eno, octadec-1-eno y docos-1-eno, los monómeros aromáticos preferidos son estireno, alfa metilestireno, 3-metilestireno, 4-dodecilestireno, 2-etil-4-bencilrestireno, 4-ciclohexilestireno, 4-propilestireno, 1-vinilnaftaleno, 2-vinilnaftaleno; los monómeros preferidos de éster carboxílico son (met)acrilato de metilo, (met)acrilato de etilo, (met)acrilato de propilo, (met)acrilato de t-butilo, (met)acrilato de pentilo, (met)acrilato de hexilo, (met)acrilato de 2-etilhexilo, (met)acrilato de octilo, (met)acrilato de laurilo, (met)acrilato de estearilo, y (met)acrilato de behenilo; las amidas preferidas son N-metil acrilamida, N-etil acrilamida, N-t-butil acrilamida, N-2-etilhexil acrilamida, N-octil acrilamida, N-lauril acrilamida, N-estearil acrilamida, N-behenil acrilamida.

y al menos una unidad estructural derivada de al menos un monómero de ácido sulfónico que tiene la fórmula general (V) y (VI):



en donde R₇ es un grupo que comprende al menos un enlace sp², A es O, N, P, S, un enlace tipo éster o amida, B es un grupo aromático monocíclico o policíclico o un grupo alifático, cada t es independientemente 0 o 1 y M⁺ es un catión. En un aspecto, R₇ es un alqueno C₂ a C₆. En otro aspecto, R₇ es eteno, buteno o propeno.

Los monómeros sulfonados preferidos incluyen uno o más de los siguientes: ácido 1-acrilamido-1-propanosulfónico, ácido 2-acrilamido-2-propanosulfónico, ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, ácido 2-metacrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, ácido 3-metacrilamido-2-hidroxi-propanosulfónico, ácido alilsulfónico, ácido metalilsulfónico, ácido aliloxibencenosulfónico, ácido metaliloxibencenosulfónico, ácido 2-hidroxi-3-(2-propeniloxi)propanosulfónico, ácido 2-metil-2-propen-1-sulfónico, ácido estirenosulfónico, ácido vinilsulfónico, 3-sulfopropilo, metacrilato de 3-sulfo-propilo, sulfometacrilamida, sulfometilmetacrilamida, y mezclas de dichos ácidos o sus sales solubles en agua.

Preferiblemente, el polímero comprende los siguientes niveles de monómeros: de aproximadamente 40 a aproximadamente 90 %, preferiblemente de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 % en peso del polímero de uno o más monómeros de ácido carboxílico; de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 %, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 % en peso del polímero de uno o más monómeros de ácido sulfónico; y opcionalmente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 % en peso del polímero de uno o más monómeros no iónicos. Un polímero especialmente preferido comprende de aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 % en peso del polímero de, al menos, un monómero de ácido carboxílico y de aproximadamente 20 % a aproximadamente 30 % en peso del polímero de, al menos, un monómero de ácido sulfónico.

En los polímeros, todos o alguno de los grupos ácido carboxílico o ácido sulfónico pueden estar presentes en forma neutralizada, es decir, el átomo de hidrógeno ácido del grupo ácido carboxílico y/o sulfónico en alguno o en todos los grupos ácidos puede estar sustituido con iones de metal, preferiblemente iones de metales alcalinos y, en particular, con iones de sodio.

El ácido carboxílico es preferiblemente ácido (met)acrílico. El monómero de ácido sulfónico es preferiblemente ácido 2-acrilamido-2-propanosulfónico (AMPS).

Los polímeros comerciales preferidos incluyen: Alcosperse 240, Aquatreat AR 540 y Aquatreat MPS comercializados por Alco Chemical; Acumer 3100, Acumer 2000, Acusol 587G y Acusol 588G comercializados por Rohm & Haas; Goodrich K-798, K-775 y K-797 comercializados por BF Goodrich; y ACP 1042 comercializado por ISP technologies Inc. Los polímeros especialmente preferidos son Acusol 587G y Acusol 588G comercializados por Rohm & Haas.

Los polímeros dispersantes adecuados incluyen polímeros carboxílicos aniónicos de bajo peso molecular. Pueden ser homopolímeros o copolímeros con un peso molecular promedio en peso inferior o igual a aproximadamente 200.000 g/mol, o inferior o igual a aproximadamente 75 000 g/mol, o inferior o igual a aproximadamente 50 000 g/mol, o de aproximadamente 3000 a aproximadamente 50 000 g/mol, preferiblemente de aproximadamente 5000 a aproximadamente 45 000 g/mol. El polímero dispersante puede ser un homopolímero de poliácrlato de bajo peso molecular, con un peso molecular promedio de 1000 a 20 000, especialmente de 2 000 a 10 000, y de forma especialmente preferida de 3000 a 5000.

El polímero dispersante puede ser un copolímero de acrílico con ácido metacrílico, acrílico y/o metacrílico con ácido maleico, y acrílico y/o metacrílico con ácido fumárico, con un peso molecular de menos de 70 000. Su peso molecular está en el intervalo de 2000 a 80 000, y más preferiblemente de 20 000 a 50 000, y en particular de 30 000 a 40 000 g/mol, y una relación entre (met)acrilato y segmentos de maleato o de fumarato de 30:1 a 1:2.

El polímero dispersante puede ser un copolímero de acrilamida y acrilato que tengan un peso molecular de 3000 a 100 000, alternativamente de 4000 a 20 000, y también puede utilizarse un contenido de acrilamida de menos del 50 %, alternativamente de menos del 20 % en peso del polímero dispersante. Alternativamente, este polímero dispersante puede tener un peso molecular de 4000 a 20 000 y un contenido de acrilamida de 0 % a 15 %, en peso del polímero.

Los polímeros dispersantes adecuados en la presente memoria también incluyen homopolímeros y copolímeros de ácido itacónico.

Alternativamente, el polímero dispersante se selecciona del grupo que consiste en polialquileniminas alcoxiladas, policarboxilatos alcoxilados, polietilenglicoles, copolímeros de estireno, ésteres de sulfato de celulosa, polisacáridos carboxilados, copolímeros anfífilos injertados y mezclas de los mismos.

Sistema blanqueador

La composición de la invención preferiblemente comprende un sistema de blanqueo que comprende un alto nivel de blanqueador, preferiblemente percarbonato junto con un activador del blanqueador o un catalizador del blanqueador o ambos. Preferiblemente, el activador del blanqueador es TAED y el catalizador del blanqueador es un catalizador del blanqueador de manganeso.

Blanqueador

Preferiblemente, la composición de la invención comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 %, más preferiblemente de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 % de blanqueador, preferiblemente percarbonato, en peso de la composición.

Los blanqueadores inorgánicos y orgánicos son adecuados para su uso en la presente memoria. Los blanqueadores inorgánicos incluyen sales perhidratadas tales como sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato. Las sales inorgánicas perhidratadas son normalmente sales de metales alcalinos. La sal inorgánica de perhidrato puede estar incluida como sólido cristalino sin ninguna otra protección adicional. Alternativamente, la sal puede estar recubierta. Los recubrimientos adecuados incluyen sulfato de sodio, carbonato de sodio, silicato de sodio y mezclas de los mismos. Dichos recubrimientos pueden aplicarse como una mezcla aplicada a la superficie o secuencialmente en capas.

Los percarbonatos de metal alcalino, especialmente el percarbonato de sodio, es el blanqueador preferido para su uso en la presente memoria. El percarbonato se incorpora lo más preferiblemente a los productos en una forma recubierta que proporciona estabilidad al producto.

El peroximonopersulfato de potasio es otra sal perhidratada inorgánica de utilidad en la presente memoria.

Los blanqueadores orgánicos típicos son los peroxiácidos orgánicos, especialmente el ácido dodecanodiperoxoico, el ácido tetradecanodiperoxoico y el ácido hexadecanodiperoxoico. El ácido monoperazelaico y el ácido diperazelaico y el ácido monoperbrasílico y el ácido diperbrasílico son también adecuados en la presente memoria. Los diacilperóxidos y tetracilperóxidos, por ejemplo, el peróxido de dibenzoilo y el peróxido de dilauroilo, son otros peróxidos orgánicos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención.

Otros blanqueadores orgánicos típicos incluyen los peroxiácidos, siendo ejemplos concretos los alquilperoxiácidos y los arilperoxiácidos. Los representantes preferidos son (a) ácido peroxibenzoico y sus derivados de anillo sustituido, tales como los ácidos alquilperoxibenzoicos, pero también ácido peroxi- α -naftoico y monoperftalato de magnesio, (b) peroxiácidos alifáticos o alifáticos sustituidos, tales como ácido peroxiláurico, ácido peroxiesteárico, ácido ϵ -ftalimidoperoxicaiproico[ácido ftaloiminoperoxihexanoico (PAP)], ácido o-carboxibenzamidoperoxicaiproico, ácido N-nonenilamidoperadípico, y N-nonenilamidopersuccinatos, y (c) ácidos peroxidicarbonílicos alifáticos y aralifáticos, tales como ácido 1,12-diperoxycarboxílico, ácido 1,9-diperoxiazelaico, ácido diperoxisebácico, ácido diperoxibrasílico, los ácidos diperoxiftálicos, ácido 2-decildiperoxibutano-1,4-dioico, N,N-tereftaloildi(ácido 6-aminopercaproico).

10 Activadores del blanqueador

Los activadores del blanqueador son de forma típica precursores de perácidos orgánicos que potencian la acción blanqueadora en el transcurso del lavado a temperaturas de 60 °C e inferiores. Activadores del blanqueador adecuados para su uso en la presente memoria incluyen compuestos que, en condiciones de perhidrólisis, proporcionan ácidos peroxycarboxílicos alifáticos que tienen preferiblemente de 1 a 12 átomos de carbono, en particular de 2 a 10 átomos de carbono, y/o ácido perbenzoico opcionalmente sustituido. Las sustancias adecuadas contienen grupos O-acilo y/o N-acilo del número de átomos de carbono especificado y/o grupos benzoílo opcionalmente sustituidos. Se da preferencia a alquilendiaminas poliaciladas, en particular tetraacetiletilendiamina (TAED), derivados acilados de triazina, en particular 1,5-diacetil-2,4-dioxohexahidro-1,3,5-triazina (DADHT), glicolurilos acilados, en particular tetraacetilglicolurilo (TAGU), N-acilimidaz, en particular N-nonanoilsuccinimida (NOSI), fenolsulfonatos acilados, en particular n-nonanoil o isononanoiloxibenzenosulfonato (n-NOBS o iso-NOBS), ácido decanoiloxibenzoico (DOBA), anhídridos carboxílicos, en particular anhídrido ftálico, alcoholes polihidroxiados acilados, en particular triacetina, diacetato de etilenglicol y 2,5-diacetoxi-2,5-dihidrofurano y también citrato de trietilacetilo (TEAC). Si está presente, la composición de la invención comprende de 0,01 a 5, preferiblemente de 0,2 a 2 % en peso de la composición de activador del blanqueador, preferiblemente TAED.

Catalizador del blanqueador

La composición de la presente memoria preferiblemente contiene un catalizador del blanqueador, preferiblemente un catalizador del blanqueador que contiene metal. Más preferiblemente, el catalizador del blanqueador que contiene metal es un catalizador del blanqueador que contiene un metal de transición, especialmente un catalizador del blanqueador que contiene manganeso o cobalto.

Los catalizadores del blanqueador preferidos para su uso en la presente memoria incluyen triazaciclononano de manganeso y complejos relacionados; bispiridilamina de Co, Cu, Mn y Fe y complejos relacionados; y pentaminacetato de cobalto(III) y complejos relacionados. El catalizador del blanqueador especialmente preferido para su uso en la presente memoria son 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano (Me-TACN) y 1,2,4,7-tetrametil-1,4,7-triazaciclononano (Me/Me-TACN).

Preferiblemente, la composición de la invención comprende de 0,001 a 0,5, más preferiblemente de 0,002 a 0,05 %, más preferiblemente de 0,005 a 0,075 % de catalizador del blanqueador en peso de la composición. Preferiblemente, el catalizador del blanqueador es un catalizador del blanqueador de manganeso.

Aditivo reforzante de la detergencia inorgánica

La composición de la invención preferiblemente comprende un aditivo reforzante de la detergencia inorgánica. Los aditivos reforzantes de la detergencia inorgánicos adecuados se seleccionan del grupo que consiste en carbonato, silicato y mezclas de los mismos. El carbonato de sodio es especialmente preferido para su uso en la presente memoria. Preferiblemente, la composición de la invención comprende de 5 a 60 %, más preferiblemente de 10 a 50 %, y especialmente de 15 a 45 % de carbonato de sodio en peso de la composición.

Tensioactivo

Los tensioactivos adecuados para su uso en la presente memoria incluyen tensioactivos no iónicos, preferiblemente las composiciones están exentas de otros tensioactivos. Tradicionalmente, los tensioactivos no iónicos se han utilizado en lavavajillas con fines de modificación de superficie, en particular para el descolgamiento para evitar la formación de películas y manchas, y para mejorar el brillo. Se ha descubierto que los tensioactivos no iónicos pueden también ayudar a evitar la redeposición de la suciedad.

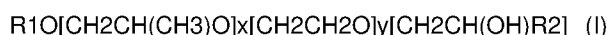
Preferiblemente la composición de la invención comprende un tensioactivo no iónico o un sistema tensioactivo no iónico, más preferiblemente el tensioactivo no iónico o el sistema tensioactivo no iónico tiene una temperatura de inversión de fase, medida a una concentración de 1 % en agua destilada, entre 40 y 70 °C, preferiblemente entre 45 y 65 °C. Por "sistema tensioactivo no iónico" se entiende en la presente memoria una mezcla de dos o más tensioactivos no iónicos. Son preferidos para su uso en la presente memoria los sistemas de tensioactivos no iónicos. Parece que presentan propiedades de limpieza y acabado mejoradas, y una mejor estabilidad en el producto que los tensioactivos no iónicos individuales.

La temperatura de inversión de fase es la temperatura por debajo de la cual un tensioactivo, o una mezcla de los mismos, se reparte preferiblemente en la fase acuosa como micelas hinchadas de aceite, y por encima de la cual se reparte preferiblemente en la fase oleosa como micelas inversas hinchadas de agua. La temperatura de inversión de fase se puede determinar visualmente identificando la temperatura a la que aparece la turbidez.

La temperatura de inversión de fase de un tensioactivo o sistema no iónico puede determinarse del siguiente modo: se prepara una solución que contiene 1 % del tensioactivo o mezcla correspondiente en peso de la solución en agua destilada. La solución se agita suavemente antes del análisis de la temperatura de inversión de fase para garantizar que el proceso se lleva a cabo en equilibrio químico. La temperatura de inversión de fase se toma en un baño termostático sumergiendo las soluciones en tubos de ensayo de vidrio precintados de 75 mm. Para garantizar la ausencia de escapes, el tubo de ensayo se pesa antes y después de la medida de la temperatura de inversión de fase. La temperatura aumenta gradualmente a una velocidad inferior a 1 °C por minuto, hasta que la temperatura alcanza unos pocos grados por debajo de la temperatura de inversión de fase previamente estimada. La temperatura de inversión de fase se determina visualmente en el primer indicio de turbidez.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen: i) tensioactivos no iónicos etoxilados, preparados por reacción de un monohidroxialcohol o alquilfenol con de 6 a 20 átomos de carbono con preferiblemente al menos 12 moles especialmente preferido al menos 16 moles, y aún más preferido al menos 20 moles de óxido de etileno por mol de alcohol o alquilfenol; ii) tensioactivos de alcohol alcóxido que tienen de 6 a 20 átomos de carbono y al menos un grupo etoxilo y un grupo propoxilo. Para su uso en la presente memoria se prefieren las mezclas de tensioactivos i) y ii).

Otros tensioactivos no iónicos adecuados son los polialcoholes oxialquilados terminalmente protegidos con grupos epoxi representados por la fórmula:



en donde R₁ es un radical hidrocarburo alifático lineal o ramificado que tiene de 4 a 18 átomos de carbono; R₂ es un radical hidrocarburo alifático lineal o ramificado que tiene de 2 a 26 átomos de carbono; x es un número entero con un valor medio de 0,5 a 1,5, más preferiblemente de aproximadamente 1; e y es un número entero con un valor de al menos 15, más preferiblemente de al menos 20.

Preferiblemente, el tensioactivo de la Fórmula I, tiene al menos aproximadamente 10 átomos de carbono en la unidad epóxido terminal [CH₂CH(OH)R₂]. Los tensioactivos de fórmula I adecuados, según la presente invención, son los tensioactivos no iónicos POLY-TERGENT® SLF-18B de Olin Corporation, como se describe, por ejemplo, en WO 94/22800, publicado el 13 de octubre de 1994 por Olin Corporation.

Enzimas

Otras proteasas

La composición de la invención puede comprender una proteasa además de la proteasa de la invención. Una mezcla de dos o más proteasas puede contribuir a una mejor limpieza en un intervalo más amplio de temperatura, duración del ciclo, y/o sustratos y proporcionar ventajas de brillo superiores, especialmente cuando se usan junto con un agente antirredeposición y/o un polímero sulfonado.

Las proteasas adecuadas para su uso junto con las variantes de proteasa de la invención incluyen metaloproteasas y serina proteasas, incluyendo serina proteasas microbianas neutras o alcalinas, tales como subtilisinas (EC 3.4.21.62). Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. En un aspecto, tal proteasa adecuada puede ser de origen microbiano. Las proteasas adecuadas incluyen mutantes modificados química o genéticamente de las proteasas adecuadas mencionadas anteriormente. En un aspecto, la proteasa adecuada puede ser una serina proteasa, tal como una proteasa alcalina microbiana o/y una proteasa de tipo tripsina. Los ejemplos de proteasas neutras o alcalinas adecuadas incluyen:

(a) subtilisinas (EC 3.4.21.62), especialmente las derivadas de *Bacillus*, tales como *Bacillus* sp., *B. lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. gibsonii* y *B. akibaii* descritas en las patentes WO2004067737, WO2015091989, WO2015091990, WO2015024739, WO2015143360, US-6,312,936 B1, US-5,679,630, US-4,760,025, DE102006022216A1, DE10200602224A1, WO2015089447, WO2015089441, WO2016066756, WO2016066757, WO2016069557, WO2016069563, WO2016069569.

(b) proteasas de tipo tripsina o de tipo quimiotripsina, tales como tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) incluidas la proteasa de *Fusarium* descrita en la patente WO 89/06270 y las proteasas de quimiotripsina derivadas de *Cellulomonas* descritas en las patentes WO 05/052161 y WO 05/052146.

(c) metaloproteasas, especialmente las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* descritas en la patente WO 07/044993A2; de *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Thermoactinomyces*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* o *Streptomyces* spp. descritas en las patentes WO2014194032, WO2014194054 y WO2014194117; de *Kribella alluminosa* descrita en la patente WO2015193488; y de *Streptomyces* y *Lisobacter* descritas en la patente WO2016075078.

(d) proteasa que tiene al menos un 90 % de identidad con la subtilasa de *Bacillus* sp. TY145, NCIMB 40339, descrita en la patente WO92/17577 (Novozymes A/S), incluidas las variantes de esta subtilasa de *Bacillus* sp TY145 descritas en las patentes WO2015024739 y WO2016066757.

Las proteasas adicionales especialmente preferidas para el detergente de la invención son polipéptidos que muestran al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 98 %, incluso más preferiblemente al menos un 99 %, y especialmente un 100 % de identidad con la enzima de tipo natural procedente de *Bacillus lentus*, que comprenden mutaciones en una o más, preferiblemente en dos o más, y más preferiblemente en tres o más de las siguientes posiciones, usando el sistema de numeración BPN', y las abreviaturas de aminoácidos como se ilustran en WO00/37627=:V68A, N76D, N87S, S99D, S99SD, S99A, S101G, S101M, S103A, V104N/I, G118V, G118R, S128L, P129Q, S130A, Y167A, R170S, A194P, V205I, Q206L/D/E, Y209W y/o M222S.

Lo más preferiblemente, la proteasa adicional se selecciona del grupo de proteasas que comprende las mutaciones siguientes (sistema de numeración BPN') contra cualquiera de PB92 natural (SEQ ID NO: 2 en la patente WO 08/010925) o la subtilisina 309 natural (secuencia según la cadena principal de PB92, excepto que comprende una variación natural de N87S).

(i) G118V + S128L + P129Q + S130A

(ii) S101M + G118V + S128L + P129Q + S130A

(iii) N76D + N87R + G118R + S128L + P129Q + S130A + S188D + N248R

(iv) N76D + N87R + G118R + S128L + P129Q + S130A + S188D + V244R

(v) N76D + N87R + G118R + S128L + P129Q + S130A

(vi) V68A + N87S + S101G + V104N

(vii) S99AD

Las enzimas proteasas comerciales adicionales adecuadas incluyen: las comercializadas con los nombres comerciales Alcalase®, Savinase®, Primase®, Durazym®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase®, Liquanase Ultra®, Savinase Ultra®, Ovozime®, Neutrase®, Everlase®, Coronase®, Blaze®, Blaze Ultra® y Esperase® de Novozymes A/S (Dinamarca); las comercializadas con los nombres comerciales Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Properase®, Purafect®, Purafect Prime®, Purafect Ox®, FN3®, FN4®, Excellase®, Ultimase® y Purafect OXP® de Dupont; las comercializadas con los nombres comerciales Opticlean® y Optimase® por Solvay Enzymes; y las comercializadas por Henkel/Kemira, concretamente BLAP (secuencia que se muestra en la Figura 29 de la patente US-5,352,604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, denominadas a continuación en la memoria BLAP), BLAP R (BLAP con S3T + V4I + V199M + V205I + L217D), BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I) y BLAP F49 (BLAP con S3T + V4I + A194P + V199M + V205I + L217D); y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus* con mutaciones A230V + S256G + S259N) de Kao.

Son especialmente preferidas para su uso en la presente memoria junto con la variante de proteasa de la invención proteasas comerciales seleccionadas del grupo que consiste en Properase®, Blaze®, Ultimase®, Everlase®, Savinase®, Excellase®, Blaze Ultra®, BLAP y variantes de BLAP.

Los niveles preferidos de proteasa en el producto de la invención incluyen de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 7 y, especialmente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 mg de proteasa activa/g de composición.

Amilasas

Preferiblemente, la composición de la invención puede comprender una amilasa. Las alfa-amilasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados química o genéticamente (variantes). Una alfa-amilasa alcalina preferida se deriva de una cepa de *Bacillus*, tal como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, u otro *Bacillus* sp., tal como *Bacillus* sp. NCBI 12289, NCBI 12512, NCBI 12513, DSM 9375 (USP 7.153.818) DSM 12368, DSM n.º 12649, KSM AP1378 (WO-97/00324), KSM K36 o KSM K38 (EP 1.022.334). Las amilasas preferidas incluyen:

(a) las variantes descritas en WO 96/23873, WO00/60060, WO06/002643 y WO2017/192657, especialmente las variantes con una o más sustituciones en las siguientes posiciones contra la enzima AA560 enumerada como SEQ ID NO: 12 en WO06/002643:

5 26, 30, 33, 82, 37, 106, 118, 128, 133, 149, 150, 160, 178, 182, 186, 193, 202, 214, 231, 246, 256, 257, 258, 269, 270, 272, 283, 295, 296, 298, 299, 303, 304, 305, 311, 314, 315, 318, 319, 339, 345, 361, 378, 383, 419, 421, 437, 441, 444, 445, 446, 447, 450, 461, 471, 482, 484, preferiblemente que contienen también las delecciones de D183* y G184*.

10 (b) las variantes que presentan al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 4 de la patente WO06/002643, la enzima natural procedente de *Bacillus* SP722, especialmente las variantes con delecciones en las posiciones 183 y 184 y las variantes descritas en las patentes WO00/60060, WO2011/100410 y WO2013/003659.

15 (c) las variantes que presentan al menos 95 % de identidad con la enzima natural procedente de *Bacillus* sp.707 (SEQ ID NO: 7 en la patente US-6,093, 562), especialmente las que comprenden una o más de las siguientes mutaciones M202, M208, S255, R172, y/o M261. Preferiblemente dicha amilasa comprende una o más de M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q, M202W, S255N y/o R172Q. Son especialmente preferidas aquellas que comprenden las mutaciones M202L o M202T.

20 (d) las variantes descritas en la patente WO 09/149130, preferiblemente aquellas que presentan al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en la patente WO 09/149130, la enzima natural de *Geobacillus* *Stearothermophilus* o una versión truncada de la misma.

25 (e) las variantes que presentan al menos 89 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 en WO2016091688, especialmente aquellas que comprenden delecciones en las posiciones H183+G184 y adicionalmente una o más mutaciones en las posiciones 405, 421, 422 y/o 428.

(f) las variantes que presentan al menos 60 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con la “α-amilasa PcuAmyl” de *Paenibacillus* *curdlandolyticus* YK9 (SEQ ID NO: 3 en la patente WO2014099523).

30 (g) las variantes que presentan al menos 60 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con la “amilasa CspAmy2” de *Cytophaga* sp. (SEQ ID NO: 1 en la patente WO2014164777).

(h) las variantes que presentan al menos 85 % de identidad con AmyE de *Bacillus* *subtilis* (SEQ ID NO: 1 de la patente WO2009149271).

35 (i) las variantes que presentan al menos 90 % de identidad con la amilasa natural de *Bacillus* sp. KSM-K38 con el número de registro AB051102.

40 (j) las variantes que presentan al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos madura de AAI10 de *Bacillus* sp (SEQ ID NO: 7 en WO2016180748)

(k) las variantes que presentan al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos madura de la amilasa de *Alicyclobacillus* sp. (SEQ ID NO: 8 de la patente WO2016180748)

45 Preferiblemente, la amilasa es una enzima de diseño, en donde uno o más de los aminoácidos propensos a la oxidación del blanqueador fueron sustituidos por un aminoácido menos propenso a la oxidación. En particular, se prefiere que los restos de metionina se sustituyan con cualquier otro aminoácido. En particular se prefiere que se sustituya la metionina más propensa a la oxidación. Preferiblemente, se sustituye la metionina en una posición equivalente a 202 en la enzima AA560 enumerada como SEQ ID NO: 12 en la patente WO06/002643. Preferiblemente, 50 la metionina en esta posición se sustituye con treonina o leucina, preferiblemente leucina.

Las alfa-amilasas comercialmente disponibles adecuadas incluyen DURAMYL®, LIQUEZYME®, TERMAMYL®, TERMAMYL ULTRA®, NATALASE®, SUPRAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, FUNGAMYL®, ATLANTIC®, INTENSA® y BAN® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), KEMZYM® AT 9000 Biozym Biotech 55 Trading GmbH Wehlstrasse 27b A-1200 Viena Austria, las series RAPIDASE®, PURASTAR®, ENZYSIZE®, OPTISIZE HT PLUS®, POWERASE®, PREFERENZ S® (incluidos PREFERENZ S1000® y PREFERENZ S2000® y PURASTAR OXAM® (DuPont., Palo Alto, California) y KAM® (Kao, 14-10 Nihonbashi Kayabacho, 1-chome, Chuo-ku Tokio 103-8210, Japón). En un aspecto, las amilasas adecuadas incluyen ATLANTIC®, STAINZYME®, 60 POWERASE®, INTENSA® y STAINZYME PLUS® y mezclas de las mismas.

Preferiblemente, el producto de la invención comprende al menos 0,01 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 6, especialmente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 mg de amilasa activa/g de composición.

65 Preferiblemente, la proteasa y/o amilasa de la composición de la invención están en forma de gránulos, los gránulos comprenden más de 29 % de sulfato de sodio en peso del gránulo y/o el sulfato de sodio y la enzima activa (proteasa

y/o amilasa) están en una relación en peso de entre 3:1 y 100:1 o preferiblemente entre 4:1 y 30:1 o más preferiblemente entre 5:1 y 20:1.

Inhibidor del crecimiento cristalino

Los inhibidores del crecimiento cristalino son materiales que se pueden unir a los cristales de carbonato de calcio e impedir el crecimiento adicional de especies tales como aragonito y calcita.

Ejemplos de inhibidores del crecimiento cristalino eficaces incluyen fosfonatos, polifosfonatos, derivados de inulina, homopolímeros de ácido poliitacónico y policarboxilatos cíclicos.

Los inhibidores del crecimiento cristalino adecuados pueden seleccionarse del grupo que comprende HEDP (ácido 1-hidroxietilideno 1,1-difosfónico), carboximetilululina (CMI), ácido tricarbálico y carboxilatos cíclicos. Para los fines de esta invención, el término carboxilato cubre tanto la forma aniónica como la forma de ácido carboxílico protonado.

Los policarboxilatos cíclicos contienen al menos dos, preferiblemente tres o preferiblemente al menos cuatro grupos carboxilato y la estructura cíclica se basa en alcano monocíclico o bicíclico o un heterociclo. Las estructuras cíclicas adecuadas incluyen ciclopropano, ciclobutano, ciclohexano o ciclopentano o cicloheptano, biciclo heptano o biciclo-octano y/o tetrahidrofurano. Un inhibidor del crecimiento cristalino preferido es el tetracarboxilato de ciclopentano.

Son preferidos los carboxilatos cíclicos que tengan al menos un 75 % y, preferiblemente, un 100 % de los grupos carboxilato en el mismo lado, o en la posición "cis" de la estructura 3D del ciclo para su uso en la presente memoria.

Se prefiere que los dos grupos carboxilato, que están en la misma cara del ciclo, se sitúen directamente adyacentes o en posiciones "orto".

Los inhibidores del crecimiento cristalino preferidos incluyen HEDP, ácido tricarbálico, ácido tetrahidrofuranotetracarboxílico (THFTCA) y ácido ciclopentanotetracarboxílico (CPTCA). El THFTCA está, preferiblemente, en la configuración 2c,3t,4t,5c y el CPTCA en la configuración cis,cis,cis,cis. El inhibidor del crecimiento cristalino especialmente preferido para su uso en la presente memoria es HEDP.

También se prefieren para su uso en la presente memoria los homopolímeros de ácido poliitacónico parcialmente descarboxilados que tienen preferiblemente un nivel de descarboxilación en el intervalo del 50 % molar al 90 % molar. El polímero especialmente preferido para su uso en la presente memoria es el Itaconix TSI® proporcionado por Itaconix.

Los inhibidores del crecimiento cristalino están presentes preferiblemente en una cantidad de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 10 %, especialmente, de aproximadamente un 0,02 a aproximadamente un 5 % y, en particular, de un 0,05 % a un 3 %, en peso de la composición.

Agentes para el cuidado de metales

Los agentes para el cuidado de metales pueden evitar o reducir el deslustre, la corrosión u oxidación de los metales, incluidos aluminio, acero inoxidable y metales no ferrosos, tales como plata y cobre. Preferiblemente, la composición de la invención comprende de 0,1 a 5 %, más preferiblemente de 0,2 a 4 % y especialmente de 0,3 a 3 % en peso del producto de un agente para el cuidado de metales preferiblemente el agente para el cuidado de metales es el benzotriazol (BTA).

Agentes para el cuidado del vidrio

Los agentes para el cuidado del vidrio protegen el aspecto de los artículos de vidrio durante el proceso de lavado en lavavajillas. Preferiblemente, la composición de la invención comprende de 0,1 a 5 %, más preferiblemente de 0,2 a 4 %, y especialmente de 0,3 a 3 % en peso de la composición de un agente para el cuidado del metal, preferiblemente el agente para el cuidado del vidrio es un material que contiene zinc, especialmente una hidrozincita. Otros agentes de cuidado del vidrio adecuados son polietilenimina (PEI). Una PEI especialmente preferida es Lupasol® FG, suministrada por BASF.

La composición para lavavajillas de la invención preferiblemente tiene un pH medido en una solución acuosa de 1 % en peso/volumen en agua destilada a 20 °C de aproximadamente 9 a aproximadamente 12, más preferiblemente de aproximadamente 10 a menos de aproximadamente 11,5 y especialmente de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 11,5.

La composición para lavavajillas de la invención preferiblemente tiene una alcalinidad de reserva de aproximadamente 10 a aproximadamente 20, más preferiblemente de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 a un pH de 9,5 medido en NaOH con 100 gramos de producto a 20 °C.

Una composición para lavavajillas preferida de la invención comprende:

- i) de 10 a 20 % en peso de la composición de blanqueador, preferiblemente percarbonato de sodio;
- 5 ii) TAED;
- iii) opcional, pero preferiblemente de 5 a 50 % en peso de la composición de un aditivo reforzante de la detergencia inorgánico, preferiblemente carbonato de sodio;
- 10 iv) opcional, pero preferiblemente de 2 a 10 % en peso de la composición de un tensioactivo no iónico;
- v) otros ingredientes opcionales incluyen: un inhibidor del crecimiento cristalino, preferiblemente HEDP, y agentes para el cuidado del vidrio.
- 15 Una composición para lavavajillas preferida de la invención comprende:
- i) de 10 a 20 % en peso de la composición de blanqueador, preferiblemente percarbonato de sodio;
- 20 ii) un catalizador del blanqueador de manganeso y, opcionalmente, TAED;
- iii) opcional, pero preferiblemente de 5 a 50 % en peso de la composición de un aditivo reforzante de la detergencia inorgánico, preferiblemente carbonato de sodio;
- 25 iv) opcional, pero preferiblemente de 2 a 10 % en peso de la composición de un tensioactivo no iónico;
- v) opcional, pero preferiblemente, un agente para el cuidado del vidrio.

No debe entenderse que las dimensiones y los valores expuestos en la presente memoria estén estrictamente limitados a los valores numéricos exactos mencionados. En vez de eso, a menos que se especifique lo contrario, se pretende que cada una de tales dimensiones signifique tanto el valor mencionado como un intervalo funcionalmente equivalente en torno a ese valor. Por ejemplo, se pretende que una dimensión expuesta como "40 mm" signifique "aproximadamente 40 mm".

Ejemplos

Las composiciones para la eliminación de yema de huevo mediante composiciones para lavavajillas que comprenden variantes de proteasas se compararon con las mismas composiciones que comprendían la proteasa original.

Se usaron las composiciones que se muestran en la Tabla 1. Se disolvieron 3 g de cada composición en un litro de agua desionizada para producir una solución limpiadora que tenía un pH de 11. La proteasa correspondiente se añadió a la solución limpiadora en cantidad de 0,25-0,75 ppm.

Tabla 1: Composiciones para lavavajillas

Ingredientes (% en peso de la sustancia activa)	ADW Fórmula A	ADW Fórmula B (comparativo)
Ingredientes sólidos		
Carbonato de sodio	41,7	41,7
Sulfato de sodio	0,00	2,03
MGDA	21,0	10,1
Citrato de sodio	0,00	10,1
TAED	1,68	1,68
Percarbonato de sodio	12,6	12,6
Polímero sulfonado	2,5	2,5
Catalizador del blanqueador	1,2	1,2
Amilasa	0,11	0,11
Ingredientes líquidos		
Lutensol T07	19,3	19,3

Tabla 1: Composiciones para limpieza en lavavajillas (ADW)

Amilasa	Stainzyme Plus®, suministrada por Novozymes
TAED	Tetraacetiltilenodiamina
MGDA	Diacetato de metilglicina trisódico, suministrado por BASF
Catalizador del blanqueador	MnTACN (1,4,7-triazaciclonoheptano de manganeso)
Polímero sulfonado	Acusol 588 suministrado por Dow Chemicals
Lutensol TO7	Tensoactivo no iónico suministrado por BASF

Método de capacidad limpiadora: Capacidad limpiadora de yema de huevo con PAS-38

- 5 La capacidad limpiadora de las variantes de proteasas enumeradas en la Tabla 2 se ensayó con respecto al precursor utilizando las composiciones para lavavajillas A y B (véase la Tabla 1), según lo medido mediante la eliminación de manchas en micromuestras de yema de huevo (PAS-38, Center for Testmaterials BV, Vlaardingen, Países Bajos). Las muestras de manchas de huevo se dimensionaron previamente para que se ajustaran a la placa de microvaloración (MTP); placa estándar de 96 pocillos. La eliminación de manchas de las muestras de huevo PAS-38 se midió después del lavado en comparación con una referencia.

Los MTP se llenaron antes de la adición de proteasa con 3 g/l de detergente y el detergente y agua desionizada.

- 15 Tras incubar las muestras de PAS-38 durante 30 °C min a 50 °C, se leyó la absorbancia a 405 nm con un lector de placas SpectraMax. Los resultados de la absorbancia se obtuvieron restando el valor del blanco de control (que no contenía proteasa) de cada valor obtenido para la muestra (en lo sucesivo, “absorbancia del blanco restada”). Para cada condición y variante, se calculó un índice de rendimiento (PI) dividiendo la absorbancia del blanco restada por el valor obtenido para la proteasa original a la misma concentración. El valor obtenido para la proteasa original se determinó a partir de una curva patrón de la proteasa original que se incluyó en la prueba y que se ajustó a una función de Langmuir.

Método 2 para determinar la actividad de la enzima proteasa: Ensayo AAPF

- 25 La actividad de proteasa de la proteasa original y de las variantes de subtilisina de la misma se sometió a ensayo midiendo la hidrólisis del N-suc-AAPF-pNA. Para el ensayo de hidrólisis de AAPF se usaron las soluciones reactivas siguientes: Tris/HCl 100 mM pH 8,6, que contiene TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de dilución de Tris); tampón Tris 100 mM pH 8,6, que contenía CaCl₂ 10 mM y TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de Tris/Ca); y suc-AAPF-pNA 160 mM en DMSO (solución madre suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Se preparó una solución de trabajo del sustrato añadiendo 1 ml de solución madre de suc-AAPF-pNA a 100 ml de tampón Tris/Ca y se mezcló bien. Una muestra de enzima se añadió a una MTP (Greiner 781101) con un contenido de 1 mg/solución de trabajo de suc-AAPF-pNA y se ensayó para determinar la actividad a 405 nm durante 3 min mediante un lector de placa SpectraMax en modo cinético a temperatura ambiente (TA). La absorbancia de un blanco sin proteasa se restó de cada lectura de muestra. La actividad de proteasa se expresó como mOD·min⁻¹.

- 35 Estabilidad de la enzima proteasa: ensayo de estabilidad

- La estabilidad de las variantes descritas en la presente memoria se midió diluyendo las variantes en un tampón de estrés y midiendo la actividad proteolítica de las variantes antes y después de una etapa de incubación térmica de 5 minutos a 56 °C usando el ensayo AAPF descrito anteriormente. La estabilidad se midió en condiciones de tampón 40 Tris-EDTA (Tris 50 mM, pH 9; EDTA 5 mM; Tween 80 al 0,005 %). Los % de la actividad residual se calcularon mediante el cociente entre la actividad bajo estrés y sin estrés y multiplicando por 100.

Tabla 2 de datos de proteasa

Variantes	Sustituciones con respecto a la Id. de sec. n.º: 1	Estabilidad	Limpieza de manchas PAS-38	
		TRIS-EDTA	ADW Fórmula A	ADW Fórmula B (comparativo)
Id. de sec. n.º: 1	Ninguna	1	1,0	1,0
WALBSP-07063	T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G	9	1,7	2,6
comparativo				
WALBSP-07078	S039E-I080V-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L	21	2,2	ND

ES 3 023 210 T3

WALBSP-07137	S039E-P054T-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L	28	2,3	ND
WALBSP-07117	S039E-I043V-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L	28	2,3	3,7
WALBSP-07119	S039E-N042R-S099R-S126A-D127E-F128G	28	2,3	3,9
WALBSP-07052	S039E-I080V-S099R-S126A-D127E-F128G	29	2,1	2,8
WALBSP-07097	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L	29	2,4	ND
WALBSP-07088	S039E-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L	30	2,3	3,6
WALBSP-07147	S039E-T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L	31	2,0	3,8
WALBSP-07127	S039E-A047V-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L	31	2,2	3,9
WALBSP-07149	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-Y203W	32	2,0	ND
WALBSP-07107	A037T-S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-M211L	32	2,3	ND
WALBSP-07129	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-V199I	34	2,3	4,3
WALBSP-07058	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G	35	2,0	2,8
WALBSP-07050	S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	35	2,0	2,9
WALBSP-07040	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G	36	2,0	3,1
WALBSP-07014	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G	37	3,6	3,9
WALBSP-07012	S039E-I043V-S099R-S126A-D127E-F128G	38	2,2	2,7
WALBSP-07080	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-N253D	38	1,7	ND
WALBSP-07109	T009E-S039E-S099R-S126A-D127E-F128G	38	2,1	3,4
WALBSP-07090	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-S255W	38	2,4	3,8
WALBSP-07041	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	38	2,0	2,9
WALBSP-07001	A037T-S039E-I043V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-	38	1,9	3,0

ES 3 023 210 T3

	S126A-D127E-F128G-N242D			
WALBSP-07024	S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	39	2,1	2,5
WALBSP-07068	S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	39	1,8	2,8
WALBSP-07042	S039E-T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G	39	2,1	2,6
WALBSP-07065	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G	39	2,1	2,7
WALBSP-07027	A037T-S039E-I043V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	39	1,9	3,0
WALBSP-07019	A037T-S039E-I043V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	39	2,1	2,9
WALBSP-07029	A037T-S039E-I043V-A047V-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	39	1,9	3,0
WALBSP-07011	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	39	2,0	2,8
WALBSP-07055	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-N242D	39	2,0	2,6
(comparativo)				
WALBSP-07054	A037T-S039E-I043V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	39	2,0	2,7
WALBSP-07030	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-N242D	39	2,0	3,0
(comparativo)				
WALBSP-07062	S039E-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G	40	2,0	2,7
WALBSP-07047	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	40	1,9	2,8
WALBSP-06998	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	40	1,9	2,7
WALBSP-07048	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-	40	2,0	3,0

ES 3 023 210 T3

(comparativo)	S099R-T114Q-S126A-D127E-N242D			
WALBSP-07051	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S126A-D127E-F128G-N242D	40	0,7	0,8
WALBSP-07045	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-F128G-N242D	40	2,1	2,6
(comparativo)				
WALBSP-07049	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	41	2,0	2,9
WALBSP-07003	S039E-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G	41	2,1	2,8
WALBSP-07004	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-N242D	41	1,9	2,6
(comparativo)				
WALBSP-07000	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	41	1,9	2,7
WALBSP-07028	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-D127E-F128G-N242D	41	2,1	2,7
(comparativo)				
WALBSP-07059	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	41	2,0	3,0
WALBSP-07022	S039E-A047V-S099R-S126A-D127E-F128G	41	2,1	2,5
WALBSP-07015	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	41	2,0	2,7
WALBSP-07033	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G	41	2,1	2,6
WALBSP-07031	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	41	2,0	2,8
WALBSP-07032	S039E-P054T-S099R-S126A-D127E-F128G	41	3,6	4,6
WALBSP-04815	A37T-S39E-I43V-A47V-P54T-T56Y-I80V-N85S-E87D-S99R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	36	2,0	2,6
WALBSP-07064	A037T-S039E-I043V-A047V-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	42	2,0	2,4

ES 3 023 210 T3

WALBSP-07005	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	42	1,9	2,5
WALBSP-07010 (comparativo)	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-D127E-F128G-N242D	42	2,1	2,9
WALBSP-07061 (comparativo)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-D127E-F128G-N242D	42	2,0	2,9
WALBSP-07072	S039E-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G	42	2,0	2,8
WALBSP-07035 (comparativo)	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-D127E-F128G-N242D	42	2,1	2,7
WALBSP-07038 (comparativo)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-F128G-N242D	43	1,9	2,8
WALBSP-07002	A037T-S039E-S099R-S126A-D127E-F128G	43	3,8	5,5
WALBSP-07067	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	43	1,8	2,9
WALBSP-07018	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	43	1,9	2,8
WALBSP-07020 (comparativo)	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-F128G-N242D	43	2,0	3,1
WALBSP-07043	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G	44	2,0	2,7
WALBSP-07023	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G	44	2,1	2,7
WALBSP-07070	A037T-S039E-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	44	2,0	2,9
WALBSP-07071 (comparativo)	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-F128G-N242D	44	1,9	3,0
WALBSP-07008	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	44	0,7	0,8

ES 3 023 210 T3

WALBSP-07025	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S126A-D127E-F128G-N242D	45	0,8	0,7
WALBSP-07009	A037T-S039E-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	45	2,1	3,2
WALBSP-07075	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G	45	1,9	2,8
WALBSP-07017	A037T-S039E-A047V-P054T-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	45	2,0	2,8
WALBSP-07069	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	46	0,8	1,0
WALBSP-07044	A037T-S039E-A047V-T056Y-I080V-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	46	2,1	2,7
WALBSP-07100	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-Q256E	47	2,3	3,8
WALBSP-07013	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	47	2,1	2,6
WALBSP-07139	S039E-S099R-S126A-D127E-F128G-Q200L	48	2,2	3,7
WALBSP-07077	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	51	2,2	3,6
WALBSP-07087	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	51	2,1	3,6
WALBSP-07138	S039E-N074D-I080V-S099R-S126A-D127E-F128G	53	2,3	3,8
WALBSP-07021	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	54	1,9	2,9
WALBSP-07039	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	54	2,0	3,0
WALBSP-07053 (comparativo)	A037T-S039E-I043V-A047V	54	0,8	0,7
WALBSP-07073 (comparativo)	A037T-S039E-I043V-A047V-N242D	54	0,7	0,9
WALBSP-07118	S039E-P054T-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G	55	2,3	4,2

WALBSP-07108	S039E-A047V-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G	55	2,3	3,3
WALBSP-07057	A037T-S039E-I043V-A047V-P054T-T056Y-N085S-E087D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G-N242D	55	2,0	2,7
WALBSP-07089	S039E-N074D-S099R-T114Q-S126A-D127E-F128G	55	2,5	3,8
WALBSP-07148	S039E-N074D-N085S-S099R-S126A-D127E-F128G	56	2,3	3,4
WALBSP-07074	A037T-S039E-I043V-A047V-T056Y-N085S-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	57	1,8	2,5
WALBSP-07079	S039E-N074D-E087D-S099R-S126A-D127E-F128G	57	2,3	ND
WALBSP-07098	S039E-I043V-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G	57	ND	3,5
WALBSP-07128	S039E-T056Y-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G	58	2,2	3,6
WALBSP-07099	S039E-N074D-S099R-S126A-D127E-F128G-N242D	77	2,2	3,8

Como puede verse en la Tabla 2, las variantes de la composición de la invención son notablemente mejores que la proteasa original para eliminar las manchas de huevo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de limpieza para lavavajillas exenta de fosfatos que comprende:
 - 5 a) del 10 % al 50 % en peso de la composición de un sistema de agentes complejantes orgánicos que comprende al menos el 15 % en peso de la composición de ácido metilglicindiacético;
 - b) una amilasa; y
 - 10 c) una proteasa en donde la proteasa es una variante que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende las mutaciones S039E-S099R-S126A-D127E-F128G.
2. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el sistema de agentes complejantes comprende un agente complejante seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido metilglicindiacético, ácido glutámico-N,N-diacético, ácido iminodisuccínico, carboximetil inulina y mezclas de los mismos, preferiblemente una sal de ácido metilglicindiacético.
- 15 3. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende un sistema de blanqueo que comprende al menos un 10 % en peso de la composición de blanqueador, preferiblemente percarbonato y opcionalmente un activador del blanqueador y/o un catalizador del blanqueador.
- 20 4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el sistema de blanqueo comprende un activador del blanqueador.
- 25 5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el sistema de blanqueo comprende un catalizador del blanqueador, preferiblemente un catalizador del blanqueador de manganeso.
6. Una composición según cualquier reivindicación anterior en donde la composición comprende un polímero dispersante, preferiblemente un polímero carboxilado/sulfonado.
- 30 7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende:
 - i) un sistema de blanqueo que comprende al menos 10 % en peso de la composición de percarbonato y opcionalmente un activador del blanqueador y/o un catalizador del blanqueador;
 - 35 ii) un tensioactivo no iónico;
 - iii) un polímero dispersante;
 - iv) una amilasa; y
 - v) opcional, pero preferiblemente, un agente para el cuidado del vidrio.
- 40 8. Un método para lavar vajilla sucia en un lavavajillas en presencia de agua dura que comprende las etapas de:
 - i) proporcionar la vajilla sucia;
 - ii) tratar la vajilla con una composición de limpieza según cualquier reivindicación anterior; y
 - 45 iii) opcionalmente aclarar la vajilla.
9. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para lavado en lavavajillas con agua dura.