



(10) **DE 10 2015 210 367 A1** 2016.12.08

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2015 210 367.6**

(22) Anmeldetag: **05.06.2015**

(43) Offenlegungstag: **08.12.2016**

(51) Int Cl.: **C12N 9/02 (2006.01)**

C11D 3/16 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

(71) Anmelder:
Henkel AG & Co. KGaA, 40589 Düsseldorf, DE

(72) Erfinder:
**Mußmann, Nina, 47877 Willich, DE; O'Connell,
Timothy, Dr., 40547 Düsseldorf, DE; Herbst,
Daniela, Dr., 40235 Düsseldorf, DE; Prüser, Inken,**

**40215 Düsseldorf, DE; Berger, Ralf G., Prof. Dr.,
30455 Hannover, DE; Linke, Diana, Dr., 31547
Rehburg-Loccum, DE; Behrens, Christoph, 30167
Hannover, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Waschmittel mit verbesserter Waschleistung, enthaltend mindestens eine Laccase**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung bestimmter Laccasen beim Waschen von Textilien sowie Waschmittel, welche diese Laccasen enthalten.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung bestimmter Laccasen beim Waschen von Textilien sowie Waschmittel, welche diese Laccasen enthalten.

[0002] Laccasen (EC 1.10.3.2) sind kupferhaltige, „blaue“ Enzyme, die in vielen Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen vorkommen. Laccasen zählen zu den Oxidoreduktasen. Das katalytisch aktive Zentrum enthält vier Kupferionen, die nach ihren spektroskopischen Eigenschaften unterschieden werden können. Das „blaue“ Typ 1-Kupfer ist an der Substratoxidation beteiligt, ein Typ 2- und zwei Typ 3-Kupferionen formen einen trinuklearen Cluster, der Sauerstoff bindet und zu Wasser reduziert. Laccasen werden auch als p-Diphenol-Oxidasen bezeichnet. Zusätzlich zu Diphenolen oxidieren Laccasen viele andere Substrate wie methoxysubstituierte Phenole und Diamine. In Bezug auf ihre Substrate sind Laccasen erstaunlich unspezifisch. Wegen ihrer breiten Substratspezifität und ihrer Fähigkeit, phenolische Verbindungen zu oxidieren, haben Laccasen großes Interesse bei industriellen Anwendungen geweckt. Viel versprechende Gebiete zur Anwendung von Laccasen schließen zum Beispiel die Delignifizierung und das Kleben von Faserplatten der Holzindustrie, das Färben von Stoffen und das Entgiften von Färbeabwässern in der Textilindustrie, sowie die Verwendung in Biosensoren ein.

[0003] Mit der Hilfe von Mediatoren, d. h. zwischengeschalteten Molekülen, können Laccasen auch Substrate oxidieren, die sie sonst nicht in der Lage wären zu oxidieren. Die Mediatoren sind typischerweise "Small Molecule Compounds", die durch Laccasen oxidiert werden. Der oxidierte Mediator oxidiert dann wiederum das tatsächliche Substrat.

[0004] Die erste Laccase wurde bereits 1883 im japanischen Lackbaum (*Rhus vernicifera*) gefunden. Laccasen finden sich in vielen Pflanzen wie Pfirsich, Tomate, Mango und Kartoffel; Laccasen sind auch aus einigen Insekten bekannt. Die am häufigsten eingesetzten Laccasen stammen jedoch aus Pilzen, beispielsweise aus den Arten *Agaricus*, *Aspergillus*, *Cerrena*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Lentinus*, *Monocillium*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Pleurotus*, *Podospira*, *Schizophyllum*, *Sporotrichum*, *Stagonospora* und *Trametes*.

[0005] In der Natur besteht die Funktion der Laccasen unter anderem in der Mitwirkung an der Dekompostierung von Lignozellulose, der Biosynthese von Zellwänden, dem Braunwerden von Früchten und Gemüse, sowie der Vorbeugung gegen mikrobiische Angriffe auf Pflanzen.

[0006] Es ist oft schwierig, farbige Flecken/Verschmutzungen effektiv aus verschmutzter Wäsche oder von einem verschmutzten Gegenstand zu entfernen. Stark farbige Flecken und Verschmutzungen, d. h. von Obst und/oder Gemüse stammende, sind beim Entfernen eine besondere Herausforderung. Diese Flecken und Verschmutzungen enthalten Farbkörper auf der Basis von Carotinoidverbindungen, wie a-, b- und g-Carotin und Lycopin, von Porphyrinen, wie Chlorophyll, und von Flavonoidpigmenten und Farbstoffbestandteilen. Diese letztere Gruppe von Farbstoffbestandteilen auf der Basis von natürlichem Flavonoid umfasst die stark farbigen Anthocyanin-Farbstoffe und -Pigmente auf der Basis von Pelargonidin, Cyanidin, Delphinidin und deren Methylestern und die Antoxanthine. Diese Verbindungen sind der Ursprung der meisten orangefarbenen, roten, violetten und blauen Farben in Früchten und sind in allen Beeren, Kirsche, roten und schwarzen Johannisbeeren, Grapefruits, Maracuja, Orangen, Zitronen, Äpfeln, Birnen, Granatapfel, Rotkohl, roten Beten und auch in Blumen reichlich vorhanden. Derivate von Cyanidin sind in bis zu 80% der pigmentierten Blätter, in bis zu 70% der Früchte und in bis zu 50% der Blumen vorhanden. Zu speziellen Beispielen solcher Verschmutzungen gehören Verschmutzungen aus Tee, Kaffee, Gewürzen wie Curry und Paprika, Orange, Tomate, Banane, Tee, Mango, Brokkoli, Möhre, rote Bete, Spinat und Gras. Kugelschreibertinte ist auch als sehr schwer zu entfernende farbige Flecken bekannt. Diese stark farbigen Flavonoid- und Carotinoid-Farbstoffe sind oft polycyclische und heterocyclische Verbindungen mit Systemen einer konjugierten Doppelbindung. Diese chemische Struktur ist oft für die deutliche Farbe der Verbindungen verantwortlich.

[0007] Die genannten Schwierigkeiten bei der Entfernung farbiger Flecken und Verschmutzungen sind besonders gravierend bei der Formulierung flüssiger Wasch- und Reinigungsmittel, da diese üblicherweise keine Bleichmittel enthalten.

[0008] Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine bislang unbekannte Laccase [Seq. ID 1] aus *Trametes species* (Tsp, DSMZ 11309), oder hierzu hinreichend ähnliche Laccasen (bezogen auf die Sequenzidentität), besonders für den Einsatz in flüssigen Wasch- oder Reinigungsmitteln geeignet und hinsichtlich der Waschleistung verbessert sind.

[0009] Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Laccase, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 70% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% und 99% identisch ist.

[0010] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Laccase, die durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Nukleinsäuresequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 70% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% und 99% identisch ist.

[0011] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Waschmittel, das mindestens eine erfindungsgemäße Laccase enthält, d. h. eine Laccase, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 70% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% und 99% identisch ist, oder eine Laccase, die durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Nukleinsäuresequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 70% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% und 99% identisch ist.

[0012] Vorteilhafterweise weist das erfindungsgemäße Mittel eine verbesserte Waschleistung, insbesondere bei der Entfernung farbiger Flecken und Verschmutzungen auf. Besonders bevorzugt eignet sich das erfindungsgemäße Mittel zur Entfernung Anthocyan-haltiger Ansammlungen.

[0013] SEQ ID NO. 1 ist die Sequenz einer Laccase aus *Trametes species* (Tsp, DSMZ 11309) (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

[0014] SEQ ID NO. 2 ist die für die Laccase mit der SEQ ID NO. 1 kodierende cDNA, d.h. ohne Introns.

[0015] Die Bestimmung der Identität von Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen erfolgt durch einen Sequenzvergleich. Dieser Sequenzvergleich basiert auf dem im Stand der Technik etablierten und üblicherweise genutzten BLAST-Algorithmus (vgl. beispielsweise Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403–410, und Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389–3402) und geschieht prinzipiell dadurch, dass ähnliche Abfolgen von Nukleotiden oder Aminosäuren in den Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen einander zugeordnet werden. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Ein weiterer im Stand der Technik verfügbarer Algorithmus ist der FASTA-Algorithmus. Sequenzvergleiche (Alignments), insbesondere multiple Sequenzvergleiche, werden mit Computerprogrammen erstellt. Häufig genutzt werden beispielsweise die Clustal-Serie (vgl. beispielsweise Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497–3500), T-Coffee (vgl. beispielsweise Notredame et al. (2000) : T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205–217) oder Programme, die auf diesen Programmen beziehungsweise Algorithmen basieren. In der vorliegenden Patentanmeldung wurden alle Sequenzvergleiche (Alignments) mit dem Computer-Programm Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit den vorgegebenen Standardparametern erstellt, dessen AlignX-Modul für die Sequenzvergleiche auf ClustalW basiert. Solch ein Vergleich erlaubt auch eine Aussage über die Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen zueinander. Sie wird üblicherweise in Prozent Identität, das heißt dem Anteil der identischen Nukleotide oder Aminosäurereste an denselben oder in einem Alignment einander entsprechenden Positionen angegeben. Der weiter gefasste Begriff der Homologie bezieht bei Aminosäuresequenzen konservierte Aminosäure-Austausche in die Betrachtung mit ein, also Aminosäuren mit ähnlicher chemischer Aktivität, da diese innerhalb des Proteins meist ähnliche chemische Aktivitäten ausüben. Daher kann die Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen auch Prozent Homologie oder Prozent Ähnlichkeit angegeben sein. Identitäts- und/oder Homologieangaben können über ganze Polypeptide oder Gene oder nur über einzelne Bereiche getroffen werden. Homologe oder identische Bereiche von verschiedenen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen sind daher durch Übereinstimmungen in den Sequenzen definiert. Solche Bereiche weisen oftmals identische Funktionen auf. Sie können klein sein und nur wenige Nukleotide oder Aminosäuren umfassen. Oftmals üben solche kleinen Bereiche für die Gesamtaktivität des Proteins essentielle

Funktionen aus. Es kann daher sinnvoll sein, Sequenzübereinstimmungen nur auf einzelne, gegebenenfalls kleine Bereiche zu beziehen. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich Identitäts- oder Homologieangaben in der vorliegenden Anmeldung aber auf die Gesamtlänge der jeweils angegebenen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz.

[0016] Die erfindungsgemäßen Laccasen sind aus Pflanzen, Pilzen und vorzugsweise aus Bakterien erhältlich, insbesondere aus Bacilli und Actinomyceten. Die die SEQ ID NO. 1 umfassende Laccase kann aus *Trametes species* gewonnen werden.

[0017] Die natürlichen Produktionsmengen der Laccasen sind allerdings oft sehr niedrig. Es kann daher sinnvoll sein, die Produktion zu erhöhen, indem man Laccasegene in fremden Produktionswirten exprimiert.

[0018] Zu diesem Zweck verwendet man in der Regel Vektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die für eine erfindungsgemäße Laccase kodiert.

[0019] Hierbei kann es sich um DNA- oder RNA-Moleküle handeln. Sie können als Einzelstrang, als ein zu diesem Einzelstrang komplementärer Einzelstrang oder als Doppelstrang vorliegen. Insbesondere bei DNA-Molekülen sind die Sequenzen beider komplementärer Stränge in jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Codons, also Basentriplets, für die gleichen Aminosäuren kodieren können, so dass eine bestimmte Aminosäuresequenz von mehreren unterschiedlichen Nukleinsäuren kodiert werden kann. Der Fachmann ist in der Lage, diese Nukleinsäuresequenzen zweifelsfrei zu bestimmen, da trotz der Degeneriertheit des genetischen Codes einzelnen Codons definierte Aminosäuren zuzuordnen sind. Daher kann der Fachmann ausgehend von einer Aminosäuresequenz für diese Aminosäuresequenz kodierende Nukleinsäuren problemlos ermitteln. Weiterhin können bei Nukleinsäuren ein oder mehrere Codons durch synonyme Codons ersetzt sein. Dieser Aspekt bezieht sich insbesondere auf die heterologe Expression der erfindungsgemäßen Enzyme. So besitzt jeder Organismus, beispielsweise eine Wirtszelle eines Produktionsstammes, eine bestimmte Codon-Verwendung. Unter Codon-Verwendung wird die Übersetzung des genetischen Codes in Aminosäuren durch den jeweiligen Organismus verstanden. Es kann zu Engpässen in der Proteinbiosynthese kommen, wenn die auf der Nukleinsäure liegenden Codons in dem Organismus einer vergleichsweise geringen Zahl von beladenen tRNA-Molekülen gegenüberstehen. Obwohl für die gleiche Aminosäure kodierend führt das dazu, dass in dem Organismus ein Codon weniger effizient translatiert wird als ein synonymes Codon, das für dieselbe Aminosäure kodiert. Auf Grund des Vorliegens einer höheren Anzahl von tRNA-Molekülen für das synonyme Codon kann dieses in dem Organismus effizienter translatiert werden.

[0020] Einem Fachmann ist es über heutzutage allgemein bekannte Methoden, wie beispielsweise die chemische Synthese oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit molekularbiologischen und/oder proteinchemischen Standardmethoden möglich, anhand bekannter DNA- und/oder Aminosäuresequenzen die entsprechenden Nukleinsäuren bis hin zu vollständigen Genen herzustellen. Derartige Methoden sind beispielsweise aus Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3. Edition Cold Spring Laboratory Press. bekannt.

[0021] Unter Vektoren werden im Sinne der vorliegenden Erfindung aus Nukleinsäuren bestehende Elemente verstanden, die als kennzeichnenden Nukleinsäurebereich eine für eine erfindungsgemäße Laccase kodierende Nukleinsäure enthalten. Sie vermögen diese in einer Spezies oder einer Zelllinie über mehrere Generationen oder Zellteilungen hinweg als stabiles genetisches Element zu etablieren. Vektoren sind insbesondere bei der Verwendung in Bakterien spezielle Plasmide, also zirkulare genetische Elemente. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird eine für eine erfindungsgemäße Laccase kodierende Nukleinsäure in einen Vektor kloniert. Zu den Vektoren zählen beispielsweise solche, deren Ursprung bakterielle Plasmide, Viren oder Bacteriophagen sind, oder überwiegend synthetische Vektoren oder Plasmide mit Elementen verschiedenster Herkunft. Mit den weiteren jeweils vorhandenen genetischen Elementen vermögen Vektoren sich in den betreffenden Wirtszellen über mehrere Generationen hinweg als stabile Einheiten zu etablieren. Sie können extrachromosomal als eigene Einheiten vorliegen oder in ein Chromosom oder chromosomale DNA integrieren.

[0022] Expressionsvektoren umfassen Nukleinsäuresequenzen, die sie dazu befähigen, in den sie enthaltenden Wirtszellen, vorzugsweise Mikroorganismen, besonders bevorzugt Bakterien, zu replizieren und dort eine enthaltene Nukleinsäure zur Expression zu bringen. Die Expression wird insbesondere von dem oder den Promotoren beeinflusst, welche die Transkription regulieren. Prinzipiell kann die Expression durch den natürlichen, ursprünglich vor der zu exprimierenden Nukleinsäure lokalisierten Promotor erfolgen, aber auch durch einen auf dem Expressionsvektor bereitgestellten Promotor der Wirtszelle oder auch durch einen modifizierten oder

einen völlig anderen Promotor eines anderen Organismus oder einer anderen Wirtszelle. Im vorliegenden Fall wird zumindest ein Promotor für die Expression einer für eine erfindungsgemäße Laccase kodierende Nukleinsäure zur Verfügung gestellt und für deren Expression genutzt. Expressionsvektoren können ferner regulierbar sein, beispielsweise durch Änderung der Kultivierungsbedingungen oder bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte der sie enthaltenen Wirtszellen oder durch Zugabe von bestimmten Substanzen, insbesondere Aktivatoren der Genexpression. Ein Beispiel für eine solche Substanz ist das Galactose-Derivat Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches als Aktivator des bakteriellen Lactose-Operons (lac-Operons) verwendet wird. Im Gegensatz zu Expressionsvektoren wird die enthaltene Nukleinsäure in Klonierungsvektoren nicht exprimiert.

[0023] Bevorzugt wird eine für eine erfindungsgemäße Laccase kodierende Nukleinsäure oder ein eine solche Nukleinsäure enthaltender Vektor in einen Mikroorganismus transformiert, der dann als Wirtszelle dient. Alternativ können auch einzelne Komponenten, d.h. Nukleinsäure-Teile oder -Fragmente einer für eine erfindungsgemäße Laccase kodierenden Nukleinsäure derart in eine Wirtszelle eingebracht werden, dass die dann resultierende Wirtszelle eine solche Nukleinsäure oder einen solchen Vektor enthält. Dieses Vorgehen eignet sich besonders dann, wenn die Wirtszelle bereits einen oder mehrere Bestandteile einer solchen Nukleinsäure oder eines solchen Vektors enthält und die weiteren Bestandteile dann entsprechend ergänzt werden. Verfahren zur Transformation von Zellen sind im Stand der Technik etabliert und dem Fachmann hinlänglich bekannt. Als Wirtszellen eignen sich prinzipiell alle Zellen, das heißt prokaryotische oder eukaryotische Zellen. Bevorzugt sind solche Wirtszellen, die sich genetisch vorteilhaft handhaben lassen, was beispielsweise die Transformation mit der Nukleinsäure oder dem Vektor und dessen stabile Etablierung angeht, beispielsweise einzelne Pilze oder Bakterien. Ferner zeichnen sich bevorzugte Wirtszellen durch eine gute mikrobiologische und biotechnologische Handhabbarkeit aus. Das betrifft beispielsweise leichte Kultivierbarkeit, hohe Wachstumsraten, geringe Anforderungen an Fermentationsmedien und gute Produktions- und Sekretionsraten für Fremdproteine. Bevorzugte erfindungsgemäße Wirtszellen sezernieren das (transgen) exprimierte Protein in das die Wirtszellen umgebende Medium. Ferner können die Laccasen von den sie produzierenden Zellen nach deren Herstellung modifiziert werden, beispielsweise durch Anknüpfung von Zuckermolekülen, Formylierungen, Aminierungen, usw. Solche posttranslationale Modifikationen können die Laccasen funktionell beeinflussen.

[0024] Für die Herstellung erfindungsgemäßer Laccasen besonders geeignet sind solche Wirtszellen, die aufgrund genetischer Regulationselemente, die beispielsweise auf dem Vektor zur Verfügung gestellt werden, aber auch von vornherein in diesen Zellen vorhanden sein können, in ihrer Aktivität regulierbar sind. Beispielsweise durch kontrollierte Zugabe von chemischen Verbindungen, die als Aktivatoren dienen, durch Änderung der Kultivierungsbedingungen oder bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte können diese zur Expression angeregt werden. Dies ermöglicht eine wirtschaftliche Produktion der erfindungsgemäßen Proteine. Ein Beispiel für eine solche Verbindung ist IPTG wie vorstehend beschrieben.

[0025] Bevorzugte Wirtszellen sind prokaryontische oder bakterielle Zellen. Bakterien zeichnen sich durch kurze Generationszeiten und geringe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Dadurch können kostengünstige Kultivierungsverfahren oder Herstellungsverfahren etabliert werden. Zudem verfügt der Fachmann bei Bakterien in der Fermentationstechnik über einen reichhaltigen Erfahrungsschatz. Für eine spezielle Produktion können aus verschiedensten, im Einzelfall experimentell zu ermittelnden Gründen wie Nährstoffquellen, Produktbildungsrate, Zeitbedarf usw., gramnegative oder grampositive Bakterien geeignet sein.

[0026] Bei gramnegativen Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli* wird eine Vielzahl von Proteinen in den periplasmatischen Raum sezerniert, also in das Kompartiment zwischen den beiden die Zellen einschließenden Membranen. Dies kann für spezielle Anwendungen vorteilhaft sein. Ferner können auch gramnegative Bakterien so ausgestaltet werden, dass sie die exprimierten Proteine nicht nur in den periplasmatischen Raum, sondern in das das Bakterium umgebende Medium ausschleusen. Grampositive Bakterien wie beispielsweise *Bacilli* oder *Actinomyceten* oder andere Vertreter der *Actinomycetales* besitzen demgegenüber keine äußere Membran, so dass sezernierte Proteine sogleich in das die Bakterien umgebende Medium, in der Regel das Nährmedium, abgegeben werden, aus welchem sich die exprimierten Proteine aufreinigen lassen. Sie können aus dem Medium direkt isoliert oder weiter prozessiert werden. Zudem sind grampositive Bakterien mit den meisten Herkunftsorganismen für technisch wichtige Enzyme verwandt oder identisch und bilden meist selbst vergleichbare Enzyme, so dass sie über eine ähnliche Codon-Verwendung verfügen und ihr Protein-Syntheseparataturgemäß entsprechend ausgerichtet ist.

[0027] Die genannten Wirtszellen können hinsichtlich ihrer Anforderungen an die Kulturbedingungen verändert sein, andere oder zusätzliche Selektionsmarker aufweisen oder noch andere oder zusätzliche Proteine

exprimieren. Es kann sich insbesondere auch um solche Wirtszellen handeln, die mehrere Proteine oder Enzyme transgen exprimieren.

[0028] Die vorliegende Erfindung ist prinzipiell auf alle Mikroorganismen, insbesondere auf alle fermentierbaren Mikroorganismen anwendbar und führt dazu, dass sich durch den Einsatz solcher Mikroorganismen erfindungsgemäße Laccasen herstellen lassen.

[0029] Besonders bevorzugte Wirtszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Laccasen sind Bakterien, insbesondere solche, die ausgewählt sind unter den Gattungen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebakterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* und *Pseudomonas* und insbesondere unter *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* und *Stenotrophomonas maltophilia*.

[0030] Die Wirtszelle kann aber auch eine eukaryontische Zelle sein, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt. Im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen sind eukaryontische Zellen in der Lage, das gebildete Protein posttranslational zu modifizieren. Beispiele dafür sind Pilze wie Actinomyceten oder Hefen wie *Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*. Dies kann beispielsweise dann besonders vorteilhaft sein, wenn die Proteine im Zusammenhang mit ihrer Synthese spezifische Modifikationen erfahren sollen, die derartige Systeme ermöglichen. Zu den Modifikationen, die eukaryontische Systeme besonders im Zusammenhang mit der Proteinsynthese durchführen, gehören beispielsweise die Bindung niedermolekularer Verbindungen wie Membrananker oder Oligosaccharide. Derartige Oligosaccharid-Modifikationen können beispielsweise zur Senkung der Allergenizität eines exprimierten Proteins wünschenswert sein. Auch eine Coexpression mit den natürlicherweise von derartigen Zellen gebildeten Enzymen, wie beispielsweise Cellulasen oder Lipasen, kann vorteilhaft sein. Ferner können sich beispielsweise thermophile pilzliche Expressionssysteme besonders zur Expression temperaturbeständiger Proteine oder Varianten eignen.

[0031] Die genannten Wirtszellen werden in üblicher Weise kultiviert und fermentiert, beispielsweise in diskontinuierlichen oder kontinuierlichen Systemen. Im ersten Fall wird ein geeignetes Nährmedium mit den Wirtszellen beimpft und das Produkt nach einem experimentell zu ermittelnden Zeitraum aus dem Medium geerntet. Kontinuierliche Fermentationen zeichnen sich durch Erreichen eines Fließgleichgewichts aus, in dem über einen vergleichsweise langen Zeitraum Zellen teilweise absterben aber auch nachwachsen und gleichzeitig aus dem Medium das gebildete Protein entnommen werden kann.

[0032] Fermentationsverfahren sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt und stellen den eigentlichen großtechnischen Produktionsschritt dar, in der Regel gefolgt von einer geeigneten Aufreinigungsmethode des hergestellten Produktes, beispielsweise einer erfindungsgemäßen Laccase.

[0033] Fermentationsverfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Fermentation über eine Zulaufstrategie durchgeführt wird, kommen insbesondere in Betracht. Hierbei werden die Medienbestandteile, die durch die fortlaufende Kultivierung verbraucht werden, zugefüttert. Hierdurch können beträchtliche Steigerungen sowohl in der Zelldichte als auch in der Zellmasse beziehungsweise Trockenmasse und/oder insbesondere in der Aktivität der interessierenden Laccase erreicht werden. Ferner kann die Fermentation auch so gestaltet werden, dass unerwünschte Stoffwechselprodukte herausgefiltert oder durch Zugabe von Puffer oder jeweils passende Gegenionen neutralisiert werden.

[0034] Die hergestellte Laccase kann aus dem Fermentationsmedium geerntet werden. Ein solches Fermentationsverfahren ist gegenüber einer Isolation der Laccase aus der Wirtszelle, d.h. einer Produktaufbereitung aus der Zellmasse (Trockenmasse) bevorzugt, erfordert jedoch die Zurverfügungstellung von geeigneten Wirtszellen oder von einem oder mehreren geeigneten Sekretionsmarkern oder -mechanismen und/oder Transportsystemen, damit die Wirtszellen die Laccase in das Fermentationsmedium sezernieren. Ohne Sekretion kann alternativ die Isolation der Laccase aus der Wirtszelle, d.h. eine Aufreinigung derselben aus der Zellmasse, erfolgen, beispielsweise unter Einsatz konventioneller Verfahren der Enzymchemie wie Salzfällung, Ultrafiltration, Ionenaustauschchromatographie und hydrophober Interaktionschromatographie. Die Aufreinigung kann durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen überwacht werden. Die Enzymaktivität des gereinigten Enzyms bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten kann bestimmt werden; in ähnlicher Weise können das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt bestimmt werden.

[0035] Überraschenderweise wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Laccasen, insbesondere die die SEQ ID NO. 1 umfassende Laccase, die Waschleistung insbesondere flüssiger Waschmittelformulierungen verbessern und nicht, wie von anderen Laccasen bekannt, die unerwünschte Verdunklung und damit Intensivierung von Flecken, insbesondere Tee- und Kaffeeflecken bewirken.

[0036] Die Konzentration der Laccasen im erfindungsgemäßen Waschmittel beträgt von 0,001 bis 0,15 Gew.-%, vorzugsweise von 0,005 bis 0,06 Gew.-%, bezogen auf aktives Protein.

[0037] Das erfindungsgemäße Waschmittel ist vorzugsweise im Temperaturbereich von 5°C bis 95°C, bevorzugt 20°C bis 60°C und besonders bevorzugt 30°C bis 40°C einsetzbar.

[0038] Das erfindungsgemäße Waschmittel kann zusätzliche Mediatoren enthalten, um die zu entfernden Farbstoffe mit höherer Effizienz zu oxidieren. Erfindungsgemäß geeignete Mediatoren sind beispielsweise Tempo (2,2,6,6-Tetramethyl-1-Piperidinyloxy), HBT (1-Hydroxybenzotriazol), ABTS (2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzthiazol-6-Sulphonat), NHA (N-Hydroxy-Acetanilid), 2,5-Xylidin, Ethanol, Kupfer, 4-Methylcatechol, N-Hydroxyphthalimid, Gallussäure, Gerbsäure, Quercetin, Syringasäure, Guaiacol, Dimethoxybenzyl alcohol, Phenol, Violursäure (Isonitrosobarbitursäure), Phenolrot, Bromphenolblau, Cellulose, p-Kumarinsäure, Rooibos, o-Kresol, Dichloroindophenol, Hydroxybenzotriazol, Cycloheximid oder Vanillin.

[0039] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Laccase zur Verbesserung der Waschleistung eines Waschmittels, insbesondere bei der Entfernung farbiger Flecken und Verschmutzungen, besonders bevorzugt bei der Entfernung Anthocyan-haltiger Anschmutzungen.

[0040] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Waschen von Textilien in tensidhaltigen wäßrigen Lösungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine tensidhaltige wäßrige Lösung einsetzt, die mindestens eine erfindungsgemäße Laccase enthält.

[0041] Das Verfahren wird in seiner einfachsten Form dadurch realisiert, dass man reinigungsbedürftige Textilien mit der wäßrigen Flotte in Kontakt bringt, wobei man eine übliche Waschmaschine einsetzen oder die Wäsche mit der Hand durchführen kann. Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, das Verfahren unter intensiver Belüftung der Waschflotte durchzuführen, wie dies bei Verwendung eines üblichen Haushaltsmaschinen-Waschprogramms der Fall ist.

[0042] Ein Waschmittel kann neben den genannten, zur Entfernung farbiger Flecken und Verschmutzungen geeigneten Laccasen, übliche mit diesem Bestandteil verträgliche Inhaltsstoffe enthalten. So kann es beispielsweise zusätzlich noch einen oder mehrere Farbübertragungsinhibitoren, diese dann vorzugsweise in Mengen von 0,1 Gew.-% bis 2 Gew.-%, insbesondere 0,2 Gew.-% bis 1 Gew.-%, enthalten, die in einer bevorzugten Ausgestaltung ausgewählt werden aus den Polymeren aus Vinylpyrrolidon, Vinylimidazol, Vinylpyridin-N-Oxid oder den Copolymeren aus diesen. Brauchbar sind sowohl Polyvinylpyrrolidone mit Molgewichten von 15000 g/mol bis 50000 g/mol wie auch Polyvinylpyrrolidone mit höheren Molgewichten von beispielsweise bis zu über 1000000 g/mol, insbesondere von 150000 g/mol bis 4000000 g/mol, N-Vinylimidazol/N-Vinylpyrrolidon-Copolymere, Polyvinylloxazolidone, Copolymere auf Basis von Vinylmonomeren und Carbonsäureamiden, pyrrolidongruppenhaltige Polyester und Polyamide, gepfropfte Polyamidoamine und Polyethylenimine, Polyamin-N-Oxid-Polymere und Polyvinylalkohole. Eingesetzt werden können aber auch enzymatische Systeme, umfassend eine Peroxidase und Wasserstoffperoxid beziehungsweise eine in Wasser Wasserstoffperoxid-liefernde Substanz. Der Zusatz einer Mediatorverbindung für die Peroxidase, zum Beispiel eines Acetosyringons, eines Phenolderivats oder eines Phenotiazins oder Phenoxazins, ist in diesem Fall bevorzugt, wobei auch zusätzlich obengenannte polymere Farbübertragungsinhibitorwirkstoffe eingesetzt werden können. Polyvinylpyrrolidon weist vorzugsweise eine durchschnittliche Molmasse im Bereich von 10000 g/mol bis 60000 g/mol, insbesondere im Bereich von 25000 g/mol bis 50000 g/mol auf. Unter den Copolymeren sind solche aus Vinylpyrrolidon und Vinylimidazol im Molverhältnis 5:1 bis 1:1 mit einer durchschnittlichen Molmasse im Bereich von 5000 g/mol bis 50000 g/mol, insbesondere 10000 g/mol bis 20000 g/mol bevorzugt.

[0043] Waschmittel, die als insbesondere pulverförmige Feststoffe, in nachverdichteter Teilchenform, in granularer Form, als homogene Lösungen oder Suspensionen vorliegen können, können außer den erfindungsgemäß eingesetzten Laccasen im Prinzip alle bekannten und in derartigen Mitteln üblichen Inhaltsstoffe enthalten. Die erfindungsgemäßen Mittel können insbesondere Buildersubstanzen, oberflächenaktive Tenside, Bleichmittel auf Basis organischer und/oder anorganischer Persauerstoffverbindungen, Bleichaktivatoren, wasser-mischbare organische Lösungsmittel, Enzyme, Sequestrierungsmittel, Elektrolyte, pH-Regulatoren und weite-

re Hilfsstoffe, wie optische Aufheller, Vergrauungsinhibitoren, Schaumregulatoren sowie Farb- und Duftstoffe enthalten.

[0044] Die Mittel enthalten vorzugsweise ein Tensid oder mehrere Tenside, wobei insbesondere anionische Tenside, nichtionische Tenside und deren Gemische, aber auch kationische, zwitterionische und amphotere Tenside in Frage kommen.

[0045] Geeignete nichtionische Tenside sind insbesondere Alkylglykoside und Ethoxylierungs- und/oder Propoxylierungsprodukte von Alkylglykosiden oder linearen oder verzweigten Alkoholen mit jeweils 12 bis 18 C-Atomen im Alkylteil und 3 bis 20, vorzugsweise 4 bis 10 Alkylethergruppen. Weiterhin sind entsprechende Ethoxylierungs- und/oder Propoxylierungsprodukte von N-Alkyl-aminen, vicinalen Diolen, Fettsäureestern und Fettsäureamiden, die hinsichtlich des Alkylteils den genannten langkettigen Alkoholderivaten entsprechen, sowie von Alkylphenolen mit 5 bis 12 C-Atomen im Alkylrest brauchbar.

[0046] Als nichtionische Tenside werden vorzugsweise alkoxylierte, vorteilhafterweise ethoxylierte, insbesondere primäre Alkohole mit vorzugsweise 8 bis 18 C-Atomen und durchschnittlich 1 bis 12 Mol Ethylenoxid (EO) pro Mol Alkohol eingesetzt, in denen der Alkoholrest linear oder bevorzugt in 2-Stellung methylverzweigt sein kann beziehungsweise lineare und methylverzweigte Reste im Gemisch enthalten kann, so wie sie üblicherweise in Oxoalkoholresten vorliegen. Insbesondere sind jedoch Alkoholethoxylate mit linearen Resten aus Alkoholen nativen Ursprungs mit 12 bis 18 C-Atomen, z.B. aus Kokos-, Palm-, Talgfett- oder Oleylalkohol, und durchschnittlich 2 bis 8 EO pro Mol Alkohol bevorzugt. Zu den bevorzugten ethoxylierten Alkoholen gehören beispielsweise C₁₂-C₁₄-Alkohole mit 3 EO oder 4 EO, C₉-C₁₁-Alkohole mit 7 EO, C₁₃-C₁₅-Alkohole mit 3 EO, 5 EO, 7 EO oder 8 EO, C₁₂-C₁₈-Alkohole mit 3 EO, 5 EO oder 7 EO und Mischungen aus diesen, wie Mischungen aus C₁₂-C₁₄-Alkohol mit 3 EO und C₁₂-C₁₈-Alkohol mit 7 EO. Die angegebenen Ethoxylierungsgrade stellen statistische Mittelwerte dar, die für ein spezielles Produkt eine ganze oder eine gebrochene Zahl sein können. Bevorzugte Alkoholethoxylate weisen eine eingeeengte Homologenverteilung auf (narrow range ethoxylates, NRE). Zusätzlich zu diesen nichtionischen Tensiden können auch Fettalkohole mit mehr als 12 EO eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind (Talg-)Fettalkohole mit 14 EO, 16 EO, 20 EO, 25 EO, 30 EO oder 40 EO. Insbesondere in Mitteln für den Einsatz in maschinellen Verfahren werden üblicherweise extrem schaumarme Verbindungen eingesetzt. Hierzu zählen vorzugsweise C₁₂-C₁₈-Alkylpolyethylenglykolpolypropylenglykolether mit jeweils bei zu 8 Mol Ethylenoxid- und Propylenoxideinheiten im Molekül. Man kann aber auch andere bekannt schaumarme nichtionische Tenside verwenden, wie zum Beispiel C₁₂-C₁₈-Alkylpolyethylenglykolpolybutylenglykolether mit jeweils bis zu 8 Mol Ethylenoxid- und Butylenoxideinheiten im Molekül sowie endgruppenverschlossene Alkylpolyalkylenglykolmischether. Besonders bevorzugt sind auch die hydroxylgruppenhaltigen alkoxylierten Alkohole, sogenannte Hydroxymischether. Zu den nichtionischen Tensiden zählen auch Alkylglykoside der allgemeinen Formel RO(G)_x eingesetzt werden, in der R einen primären geradkettigen oder methylverzweigten, insbesondere in 2-Stellung methylverzweigten aliphatischen Rest mit 8 bis 22, vorzugsweise 12 bis 18 C-Atomen bedeutet und G für eine Glykoseeinheit mit 5 oder 6 C-Atomen, vorzugsweise für Glucose, steht. Der Oligomerisierungsgrad x, der die Verteilung von Monoglykosiden und Oligoglykosiden angibt, ist eine beliebige Zahl – die als analytisch zu bestimmende Größe auch gebrochene Werte annehmen kann – zwischen 1 und 10; vorzugsweise liegt x bei 1,2 bis 1,4. Ebenfalls geeignet sind Polyhydroxyfettsäureamide der Formel



in der R¹CO für einen aliphatischen Acylrest mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, R² für Wasserstoff, einen Alkyl- oder Hydroxyalkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen und [Z] für einen linearen oder verzweigten Polyhydroxyalkylrest mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen und 3 bis 10 Hydroxylgruppen steht.

[0047] Vorzugsweise leiten sich die Polyhydroxyfettsäureamide von reduzierenden Zuckern mit 5 oder 6 Kohlenstoffatomen, insbesondere von der Glucose ab. Zur Gruppe der Polyhydroxyfettsäureamide gehören auch Verbindungen der Formel



in der R^3 für einen linearen oder verzweigten Alkyl- oder Alkenylrest mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, R^4 für einen linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylrest oder einen Arylrest mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen und R^5 für einen linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylrest oder einen Arylrest oder einen Oxy-Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen steht, wobei C_1 - C_4 -Alkyl- oder Phenylreste bevorzugt sind, und [Z] für einen linearen Polyhydroxyalkylrest, dessen Alkylkette mit mindestens zwei Hydroxylgruppen substituiert ist, oder alkoxylierte, vorzugsweise ethoxylierte oder propoxylierte Derivate dieses Restes steht. [Z] wird auch hier vorzugsweise durch reduktive Aminierung eines Zuckers wie Glucose, Fructose, Maltose, Lactose, Galactose, Mannose oder Xylose erhalten. Die N-Alkoxy- oder N-Aryloxy-substituierten Verbindungen können durch Umsetzung mit Fettsäuremethylestern in Gegenwart eines Alkoxids als Katalysator in die gewünschten Polyhydroxyfettsäureamide überführt werden. Eine weitere Klasse bevorzugt eingesetzter nichtionischer Tenside, die entweder als alleiniges nichtionisches Tensid oder in Kombination mit anderen nichtionischen Tensiden, insbesondere zusammen mit alkoxylierten Fettalkoholen und/oder Alkylglykosiden, eingesetzt werden, sind alkoxylierte, vorzugsweise ethoxylierte oder propoxylierte Fettsäurealkylester, vorzugsweise mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Alkylkette, insbesondere Fettsäuremethylester. Auch nichtionische Tenside vom Typ der Aminoxide, beispielsweise N-Kokosalkyl-N,N-dimethylaminoxid und N-Talgalkyl-N,N-dihydroxyethylaminoxid, und der Fettsäurealkanolamide können geeignet sein. Die Menge dieser nichtionischen Tenside beträgt vorzugsweise nicht mehr als die der ethoxylierten Fettalkohole, insbesondere nicht mehr als die Hälfte davon. Als weitere Tenside kommen sogenannte Gemini-Tenside in Betracht. Hierunter werden im Allgemeinen solche Verbindungen verstanden, die zwei hydrophile Gruppen pro Molekül besitzen. Diese Gruppen sind in der Regel durch einen sogenannten „Spacer“ voneinander getrennt. Dieser Spacer ist in der Regel eine Kohlenstoffkette, die lang genug sein sollte, dass die hydrophilen Gruppen einen ausreichenden Abstand haben, damit sie unabhängig voneinander agieren können. Derartige Tenside zeichnen sich im Allgemeinen durch eine ungewöhnlich geringe kritische Micellkonzentration und die Fähigkeit, die Oberflächenspannung des Wassers stark zu reduzieren, aus. In Ausnahmefällen werden unter dem Ausdruck Gemini-Tenside nicht nur derartig „dimere“, sondern auch entsprechend „trimere“ Tenside verstanden. Geeignete Gemini-Tenside sind beispielsweise sulfatierte Hydroxymischether oder Dimeralkohol-bis- und Trimeralkohol-tris-sulfate und -ethersulfate. Endgruppenverschlossene dimere und trimere Mischether zeichnen sich insbesondere durch ihre Bi- und Multifunktionalität aus. So besitzen die genannten endgruppenverschlossenen Tenside gute Netzzeigenschaften und sind dabei schaumarm, so dass sie sich insbesondere für den Einsatz in maschinellen Wasch- oder Reinigungsverfahren eignen. Eingesetzt werden können aber auch Gemini-Polyhydroxyfettsäureamide oder Poly-Polyhydroxyfettsäureamide.

[0048] Geeignete anionische Tenside sind insbesondere Seifen und solche, die Sulfat- oder Sulfonat-Gruppen enthalten. Als Tenside vom Sulfonat-Typ kommen vorzugsweise C_9 - C_{13} -Alkylbenzolsulfonate, Olefinsulfonate, das heißt Gemische aus Alken- und Hydroxyalkansulfonaten sowie Disulfonaten, wie man sie beispielsweise aus C_{12} - C_{18} -Monoolefinen mit end- oder innenständiger Doppelbindung durch Sulfonieren mit gasförmigem Schwefeltrioxid und anschließende alkalische oder saure Hydrolyse der Sulfonierungsprodukte erhält, in Betracht. Geeignet sind auch Alkansulfonate, die aus C_{12} - C_{18} -Alkanen beispielsweise durch Sulfochlorierung oder Sulfoxidation mit anschließender Hydrolyse beziehungsweise Neutralisation gewonnen werden. Geeignet sind auch die Ester von α -Sulfofettsäuren (Estersulfonate), zum Beispiel die α -sulfonierten Methylester der hydrierten Kokos-, Palmkern- oder Talgfettsäuren, die durch α -Sulfonierung der Methylester von Fettsäuren pflanzlichen und/oder tierischen Ursprungs mit 8 bis 20 C-Atomen im Fettsäuremolekül und nachfolgende Neutralisation zu wasserlöslichen Mono-Salzen hergestellt werden, in Betracht. Vorzugsweise handelt es sich hierbei um die α -sulfonierten Ester der hydrierten Kokos-, Palm-, Palmkern- oder Talgfettsäuren, wobei auch Sulfonierungsprodukte von ungesättigten Fettsäuren, beispielsweise Ölsäure, in geringen Mengen, vorzugsweise in Mengen nicht oberhalb etwa 2 bis 3 Gew.-%, vorhanden sein können. Insbesondere sind α -Sulfofettsäurealkylester bevorzugt, die eine Alkylkette mit nicht mehr als 4 C-Atomen in der Estergruppe aufweisen, beispielsweise Methylester, Ethylester, Propylester und Butylester. Mit besonderem Vorteil werden die Methylester der α -Sulfofettsäuren (MES), aber auch deren verseifte Disalze eingesetzt. Weitere geeignete Anionentenside sind sulfierte Fettsäureglycerinester, welche Mono-, Di- und Triester sowie deren Gemische darstellen, wie sie bei der Herstellung durch Veresterung durch ein Monoglycerin mit 1 bis 3 Mol Fettsäure oder bei der Umesterung von Triglyceriden mit 0,3 bis 2 Mol Glycerin erhalten werden. Als Alk(en)ylsulfate werden die Alkali- und insbesondere die Natriumsalze der Schwefelsäurehalbester der C_{12} - C_{18} -Fettalkohole beispielsweise aus Kokosfettalkohol, Talgfettalkohol, Lauryl-, Myristyl-, Cetyl- oder Stearylalkohol oder der C_{10} - C_{20} -Oxoalkohole und diejenigen Halbestern sekundärer Alkohole dieser Kettenlänge bevorzugt. Weiterhin bevorzugt sind Alk(en)ylsulfate der genannten Kettenlänge, welche einen synthetischen, auf petrochemischer Basis hergestellten geradkettigen Alkylrest enthalten, die ein analoges Abbauverhalten besitzen wie die adäquaten Verbindungen auf der Basis von fettchemischen Rohstoffen. Aus waschtechnischem Interesse sind C_{12} - C_{16} -Alkylsulfate und C_{12} - C_{15} -Alkylsulfate sowie C_{14} - C_{15} -Alkylsulfate insbesondere bevorzugt. Auch 2,3-Alkylsulfate, welche als Handelsprodukte der Shell Oil Company unter dem Namen DAN® erhalten werden können, sind geeignete

Aniontenside. Geeignet sind auch die Schwefelsäuremonoester der mit 1 bis 6 Mol Ethylenoxid ethoxylierten geradkettigen oder verzweigten C₇-C₂₁-Alkohole, wie 2-Methylverzweigte C₉-C₁₁-Alkohole mit im Durchschnitt 3,5 Mol Ethylenoxid (EO) oder C₁₂-C₁₈-Fettalkohole mit 1 bis 4 EO. Zu den bevorzugten Aniontensiden gehören auch die Salze der Alkylsulfobornsteinsäure, die auch als Sulfosuccinate oder als Sulfobornsteinsäureester bezeichnet werden, und die Monoester und/oder Diester der Sulfobornsteinsäure mit Alkoholen, vorzugsweise Fettalkoholen und insbesondere ethoxylierten Fettalkoholen darstellen. Bevorzugte Sulfosuccinate enthalten C₈- bis C₁₈-Fettalkoholreste oder Mischungen aus diesen. Insbesondere bevorzugte Sulfosuccinate enthalten einen Fettalkoholrest, der sich von ethoxylierten Fettalkoholen ableitet, die für sich betrachtet nichtionische Tenside darstellen. Dabei sind wiederum Sulfosuccinate, deren Fettalkohol-Reste sich von ethoxylierten Fettalkoholen mit eingengter Homologenverteilung ableiten, besonders bevorzugt. Ebenso ist es auch möglich, Alk(en)ylbornsteinsäure mit vorzugsweise 8 bis 18 Kohlenstoffatomen in der Alk(en)ylkette oder deren Salze einzusetzen. Als weitere anionische Tenside kommen Fettsäure-Derivate von Aminosäuren, beispielsweise von N-Methyltaurin (Tauride) und/oder von N-Methylglycin (Sarkoside) in Betracht. Insbesondere bevorzugt sind dabei die Sarkoside beziehungsweise die Sarkosinate und hier vor allem Sarkosinate von höheren und gegebenenfalls einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Oleylsarkosinat. Als weitere anionische Tenside kommen insbesondere Seifen in Betracht. Geeignet sind insbesondere gesättigte Fettsäureseifen, wie die Salze der Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, hydrierten Erucasäure und Behensäure sowie insbesondere aus natürlichen Fettsäuren, zum Beispiel Kokos-, Palmkern- oder Talgfettsäuren, abgeleitete Seifengemische. Zusammen mit diesen Seifen oder als Ersatzmittel für Seifen können auch die bekannten Alkenylbornsteinsäuresalze eingesetzt werden.

[0049] Die anionischen Tenside, einschließlich der Seifen, können in Form ihrer Natrium-, Kalium- oder Ammoniumsalze sowie als lösliche Salze organischer Basen, wie Mono-, Di- oder Triethanolamin, vorliegen. Vorzugsweise liegen die anionischen Tenside in Form ihrer Natrium- oder Kaliumsalze, insbesondere in Form der Natriumsalze vor. Tenside sind in Waschmitteln in Mengenanteilen von normalerweise 1 Gew.-% bis 50 Gew.-%, insbesondere von 5 Gew.-% bis 30 Gew.-%, enthalten.

[0050] Ein Waschmittel enthält vorzugsweise mindestens einen wasserlöslichen und/oder wasserunlöslichen, organischen und/oder anorganischen Builder. Zu den wasserlöslichen organischen Buildersubstanzen gehören Polycarbonsäuren, insbesondere Citronensäure und Zuckersäuren, monomere und polymere Aminopolycarbonsäuren, insbesondere Glycindiessigsäure, Methylglycindiessigsäure, Nitrilotriessigsäure, Iminodisuccinate wie Ethylendiamin-N,N'-dibornsteinsäure und Hydroxyiminodisuccinate, Ethylendiamintetraessigsäure sowie Polyasparaginsäure, Polyphosphonsäuren, insbesondere Aminotris(methylenphosphonsäure), Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure), Lysintetra(methylenphosphonsäure) und 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure, polymere Hydroxyverbindungen wie Dextrin sowie polymere (Poly-)carbonsäuren, insbesondere durch Oxidation von Polysacchariden zugängliche Polycarboxylate, polymere Acrylsäuren, Methacrylsäuren, Maleinsäuren und Mischpolymere aus diesen, die auch geringe Anteile polymerisierbarer Substanzen ohne Carbonsäurefunktionalität einpolymerisiert enthalten können. Die relative mittlere Molekülmasse der Homopolymeren ungesättigter Carbonsäuren liegt im allgemeinen zwischen 5000 g/mol und 200000 g/mol, die der Copolymeren zwischen 2000 g/mol und 200000 g/mol, vorzugsweise 50000 g/mol bis 120000 g/mol, jeweils bezogen auf freie Säure. Ein besonders bevorzugtes Acrylsäure-Maleinsäure-Copolymer weist eine relative mittlere Molekülmasse von 50000 bis 100000 auf. Geeignete, wenn auch weniger bevorzugte Verbindungen dieser Klasse sind Copolymere der Acrylsäure oder Methacrylsäure mit Vinylethern, wie Vinylmethylethern, Vinylester, Ethylen, Propylen und Styrol, in denen der Anteil der Säure mindestens 50 Gew.-% beträgt. Als wasserlösliche organische Buildersubstanzen können auch Terpolymere eingesetzt werden, die als Monomere zwei ungesättigte Säuren und/oder deren Salze sowie als drittes Monomer Vinylalkohol und/oder ein Vinylalkohol-Derivat oder ein Kohlenhydrat enthalten. Das erste saure Monomer beziehungsweise dessen Salz leitet sich von einer monoethylenisch ungesättigten C₃-C₈-Carbonsäure und vorzugsweise von einer C₃-C₄-Monocarbonsäure, insbesondere von (Meth)acrylsäure ab. Das zweite saure Monomer beziehungsweise dessen Salz kann ein Derivat einer C₄-C₈-Dicarbonsäure sein, wobei Maleinsäure besonders bevorzugt ist. Die dritte monomere Einheit wird in diesem Fall von Vinylalkohol und/oder vorzugsweise einem veresterten Vinylalkohol gebildet. Insbesondere sind Vinylalkohol-Derivate bevorzugt, welche einen Ester aus kurzkettigen Carbonsäuren, beispielsweise von C₁-C₄-Carbonsäuren, mit Vinylalkohol darstellen. Bevorzugte Polymere enthalten dabei 60 Gew.-% bis 95 Gew.-%, insbesondere 70 Gew.-% bis 90 Gew.-% (Meth)acrylsäure bzw. (Meth)acrylat, besonders bevorzugt Acrylsäure bzw. Acrylat, und Maleinsäure bzw. Maleinat sowie 5 Gew.-% bis 40 Gew.-%, vorzugsweise 10 Gew.-% bis 30 Gew.-% Vinylalkohol und/oder Vinylacetat. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Polymere, in denen das Gewichtsverhältnis von (Meth)acrylsäure beziehungsweise (Meth)acrylat zu Maleinsäure beziehungsweise Maleinat zwischen 1:1 und 4:1, vorzugsweise zwischen 2:1 und 3:1 und insbesondere 2:1 und 2,5:1 liegt. Dabei sind sowohl die Mengen als auch die Gewichtsverhältnisse auf die Säuren bezogen. Das zweite saure Monomer beziehungsweise dessen Salz kann auch ein Derivat einer Allylsulfon-

säure sein, die in 2-Stellung mit einem Alkylrest, vorzugsweise mit einem C₁-C₄-Alkylrest, oder einem aromatischen Rest, der sich vorzugsweise von Benzol oder Benzol-Derivaten ableitet, substituiert ist. Bevorzugte Terpolymere enthalten dabei 40 Gew.-% bis 60 Gew.-%, insbesondere 45 bis 55 Gew.-% (Meth)acrylsäure beziehungsweise (Meth)acrylat, besonders bevorzugt Acrylsäure beziehungsweise Acrylat, 10 Gew.-% bis 30 Gew.-%, vorzugsweise 15 Gew.-% bis 25 Gew.-% Methallylsulfonsäure bzw. Methallylsulfonat und als drittes Monomer 15 Gew.-% bis 40 Gew.-%, vorzugsweise 20 Gew.-% bis 40 Gew.-% eines Kohlenhydrats. Dieses Kohlenhydrat kann dabei beispielsweise ein Mono-, Di-, Oligo- oder Polysaccharid sein, wobei Mono-, Di- oder Oligosaccharide bevorzugt sind. Besonders bevorzugt ist Saccharose. Durch den Einsatz des dritten Monomers werden vermutlich Sollbruchstellen in das Polymer eingebaut, die für die gute biologische Abbaubarkeit des Polymers verantwortlich sind. Diese Terpolymere weisen im Allgemeinen eine relative mittlere Molekülmasse zwischen 1000 g/mol und 200000 g/mol, vorzugsweise zwischen 200 g/mol und 50000 g/mol auf. Weitere bevorzugte Copolymere sind solche, die als Monomere Acrolein und Acrylsäure/Acrylsäuresalze beziehungsweise Vinylacetat aufweisen. Die organischen Buildersubstanzen können, insbesondere zur Herstellung flüssiger Mittel, in Form wässriger Lösungen, vorzugsweise in Form 30- bis 50-gewichtsprozentiger wässriger Lösungen eingesetzt werden. Alle genannten Säuren werden in der Regel in Form ihrer wasserlöslichen Salze, insbesondere ihre Alkalisalze, eingesetzt.

[0051] Derartige organische Buildersubstanzen können gewünschtenfalls in Mengen bis zu 40 Gew.-%, insbesondere bis zu 25 Gew.-% und vorzugsweise von 1 Gew.-% bis 8 Gew.-% enthalten sein. Mengen nahe der genannten Obergrenze werden vorzugsweise in pastenförmigen oder flüssigen, insbesondere wasserhaltigen, Mitteln eingesetzt.

[0052] Als wasserlösliche anorganische Buildermaterialien kommen insbesondere Polyphosphate, vorzugsweise Natriumtriphosphat, in Betracht. Als wasserunlösliche anorganische Buildermaterialien werden insbesondere kristalline oder amorphe, wasserdispergierbare Alkalialumosilikate, in Mengen nicht über 25 Gew.-%, vorzugsweise von 3 Gew.-% bis 20 Gew.-% und insbesondere in Mengen von 5 Gew.-% bis 15 Gew.-% eingesetzt. Unter diesen sind die kristallinen Natriumalumosilikate in Waschmittelqualität, insbesondere Zeolith A, Zeolith P sowie Zeolith MAP und gegebenenfalls Zeolith X, bevorzugt. Mengen nahe der genannten Obergrenze werden vorzugsweise in festen, teilchenförmigen Mitteln eingesetzt. Geeignete Alumosilikate weisen insbesondere keine Teilchen mit einer Korngröße über 30 µm auf und bestehen vorzugsweise zu wenigstens 80 Gew.-% aus Teilchen mit einer Größe unter 10 µm. Ihr Calciumbindevermögen liegt in der Regel im Bereich von 100 bis 200 mg CaO pro Gramm.

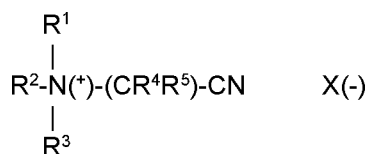
[0053] Zusätzlich oder alternativ zum genannten wasserunlöslichen Alumosilikat und Alkalicarbonat können weitere wasserlösliche anorganische Buildermaterialien enthalten sein. Zu diesen gehören neben den Polyphosphaten wie Natriumtriphosphat insbesondere die wasserlöslichen kristallinen und/oder amorphen Alkalisilikat-BUILDER. Derartige wasserlösliche anorganische Buildermaterialien sind in den Mitteln vorzugsweise in Mengen von 1 Gew.-% bis 20 Gew.-%, insbesondere von 5 Gew.-% bis 15 Gew.-% enthalten. Die als Buildermaterialien brauchbaren Alkalisilikate weisen vorzugsweise ein molares Verhältnis von Alkalioxid zu SiO₂ unter 0,95, insbesondere von 1:1,1 bis 1:12 auf und können amorph oder kristallin vorliegen. Bevorzugte Alkalisilikate sind die Natriumsilikate, insbesondere die amorphen Natriumsilikate, mit einem molaren Verhältnis Na₂O:SiO₂ von 1:2 bis 1:2,8. Als kristalline Silikate, die allein oder im Gemisch mit amorphen Silikaten vorliegen können, werden vorzugsweise kristalline Schichtsilikate der allgemeinen Formel Na₂Si_xO_{2x+1}·yH₂O eingesetzt, in der x, das sogenannte Modul, eine Zahl von 1,9 bis 4 und y eine Zahl von 0 bis 20 ist und bevorzugte Werte für x 2, 3 oder 4 sind. Bevorzugte kristalline Schichtsilikate sind solche, bei denen x in der genannten allgemeinen Formel die Werte 2 oder 3 annimmt. Insbesondere sind sowohl β- als auch δ-Natriumdisilikate (Na₂Si₂O₅·yH₂O) bevorzugt. Auch aus amorphen Alkalisilikaten hergestellte, praktisch wasserfreie kristalline Alkalisilikate der obengenannten allgemeinen Formel, in der x eine Zahl von 1,9 bis 2,1 bedeutet, können in den Mitteln eingesetzt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein kristallines Natriumschichtsilikat mit einem Modul von 2 bis 3 eingesetzt, wie es aus Sand und Soda hergestellt werden kann. Natriumsilikate mit einem Modul im Bereich von 1,9 bis 3,5 werden in einer weiteren Ausführungsform eingesetzt. In einer bevorzugten Ausgestaltung solcher Mittel setzt man ein granulares Compound aus Alkalisilikat und Alkalicarbonat ein, wie es zum Beispiel unter dem Namen Nabion® 15 im Handel erhältlich ist.

[0054] Als Bleichmittel kommen solche auf Chlorbasis, wie insbesondere Alkalihypochlorit, Dichlorisocyanursäure, Trichlorisocyanursäure und deren Salze, insbesondere aber auch solche auf Persauerstoffbasis in Frage. Als geeignete Persauerstoffverbindungen kommen insbesondere organische Persäuren beziehungsweise persäure Salze organischer Säuren, wie Phthalimidopercapronsäure, Perbenzoesäure, Monoperoxyphthal-säure, und Diperdodecandisäure sowie deren Salze wie Magnesiummonoperoxyphthalat, Wasserstoffperoxid und unter den Einsatzbedingungen Wasserstoffperoxid abgebende anorganische Salze, wie Perborat, Per-

carbonat und/oder Persilikat, und Wasserstoffperoxid-Einschlußverbindungen, wie H_2O_2 -Harnstoffaddukte, in Betracht. Wasserstoffperoxid kann dabei auch mit Hilfe eines enzymatischen Systems, das heißt einer Oxidase und ihres Substrats, erzeugt werden. Sofern feste Persauerstoffverbindungen eingesetzt werden sollen, können diese in Form von Pulvern oder Granulaten verwendet werden, die auch in im Prinzip bekannter Weise umhüllt sein können. Besonders bevorzugt wird Alkalipercarbonat, Alkaliperborat-Monohydrat oder Wasserstoffperoxid in Form wäßriger Lösungen, die 3 Gew.-% bis 10 Gew.-% Wasserstoffperoxid enthalten, eingesetzt. Falls ein Waschmittel Persauerstoffverbindungen enthält, sind diese in Mengen von vorzugsweise bis zu 25 Gew.-%, insbesondere von 1 Gew.-% bis 20 Gew.-% und besonders bevorzugt von 7 Gew.-% bis 20 Gew.-% vorhanden.

[0055] Als bleichaktivierende, unter Perhydrolysebedingungen Peroxocarbonsäure-liefernde Verbindung können insbesondere Verbindungen, die unter Perhydrolysebedingungen gegebenenfalls substituierte Perbenzoesäure und/oder aliphatische Peroxocarbonsäuren mit 1 bis 12 C-Atomen, insbesondere 2 bis 4 C-Atomen ergeben, allein oder in Mischungen, eingesetzt werden. Geeignet Bleichaktivatoren, die O- und/oder N-Acylgruppen insbesondere der genannten C-Atomzahl und/oder gegebenenfalls substituierte Benzoylgruppen tragen. Bevorzugt sind mehrfach acylierte Alkylendiamine, insbesondere Tetraacetylthyldiamin (TAED), acylierte Glykolluride, insbesondere Tetraacetylglukoluril (TAGU), acylierte Triazinderivate, insbesondere 1,5-Diacetyl-2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazin (DADHT), N-Acylimide, insbesondere N-Nonanoylsuccinimid (NOSI), acylierte Phenolsulfonate oder -carboxylate beziehungsweise die Sulfon- oder Carbonsäuren von diesen, insbesondere Nonanoyl- oder Isononanoyl- oder Lauroyloxybenzolsulfonat (NOBS beziehungsweise iso-NOBS beziehungsweise LOBS) oder Decanoyloxybenzoat (DOBA), deren formale Kohlensäureesterderivate wie 4-(2-Decanoyloxyethoxycarbonyloxy)-benzolsulfonat (DECOBS), acylierte mehrwertige Alkohole, insbesondere Triacetin, Ethylenglykoldiacetat und 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran sowie acetyliertes Sorbitol und Mannitol und deren Mischungen (SORMAN), acylierte Zuckerderivate, insbesondere Pentaacetylglukose (PAG), Pentaacetylfructose, Tetraacetylxylose und Octaacetylactose, acetyliertes, gegebenenfalls N-alkyliertes Glucamin und Gluconolacton, und/oder N-acylierte Lactame, beispielsweise N-Benzoylcaprolactam.

[0056] Zusätzlich zu den Verbindungen, die unter Perhydrolysebedingungen Peroxocarbonsäuren bilden, können weitere bleichaktivierende Verbindungen, wie beispielsweise Nitrile, aus denen sich unter Perhydrolysebedingungen Perimidsäuren bilden, vorhanden sein. Dazu gehören insbesondere Aminoacetonitrilderivate mit quaternisiertem Stickstoffatom gemäß der Formel



in der R^1 für -H, - CH_3 , einen C_{2-24} -Alkyl- oder -Alkenylrest, einen substituierten C_{1-24} -Alkyl- oder C_{2-24} -Alkenylrest mit mindestens einem Substituenten aus der Gruppe -Cl, -Br, -OH, - NH_2 , -CN und - $\text{N}^{(+)}\text{-CH}_2\text{-CN}$, einen Alkyl- oder Alkenylarylrest mit einer C_{1-24} -Alkylgruppe, oder für einen substituierten Alkyl- oder Alkenylarylrest mit mindestens einer, vorzugsweise zwei, gegebenenfalls substituierten C_{1-24} -Alkylgruppe(n) und gegebenenfalls weiteren Substituenten am aromatischen Ring steht, R^2 und R^3 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus - $\text{CH}_2\text{-CN}$, - CH_3 , - $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, - $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_3$, - $\text{CH}_2\text{-OH}$, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$, - $\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_3$, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$, - $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_3$, - $\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n\text{H}$ mit $n = 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6, R^4 und R^5 unabhängig voneinander eine voranstehend für R^1 , R^2 oder R^3 angegebene Bedeutung haben, wobei mindestens 2 der genannten Reste, insbesondere R^2 und R^3 , auch unter Einschluß des Stickstoffatoms und gegebenenfalls weiterer Heteroatome ringschließend miteinander verknüpft sein können und dann vorzugsweise einen Morpholino-Ring ausbilden, und X ein ladungsausgleichendes Anion, vorzugsweise ausgewählt aus Benzolsulfonat, Toluolsulfonat, Cumolsulfonat, den C_{9-15} -Alkylbenzolsulfonaten, den C_{1-20} -Alkylsulfaten, den C_{8-22} -Carbonsäuremethylestersulfonaten, Sulfat, Hydrogensulfat und deren Gemischen, ist, können eingesetzt werden. Auch sauerstoffübertragende Sulfonimine und/oder Acylhydrazone können eingesetzt werden.

[0057] Auch die Anwesenheit von bleichkatalysierenden Übergangsmetallkomplexen ist möglich. Diese werden vorzugsweise unter den Cobalt-, Eisen-, Kupfer-, Titan-, Vanadium-, Mangan- und Rutheniumkomplexen ausgewählt. Als Liganden in derartigen Übergangsmetallkomplexen kommen sowohl anorganische als auch organische Verbindungen in Frage, zu denen neben Carboxylaten insbesondere Verbindungen mit primären, sekundären und/oder tertiären Amin- und/oder Alkohol-Funktionen, wie Pyridin, Pyridazin, Pyrimidin, Pyrazin, Imidazol, Pyrazol, Triazol, 2,2'-Bispyridylamin, Tris-(2-pyridylmethyl)amin, 1,4,7-Triazacyclononan, 1,4,7-Trimethyl-1,4,7-triazacyclononan, 1,5,9-Trimethyl-1,5,9-triazacyclododecan, (Bis-((1-methylimidazol-2-yl)

-methyl)-(2-pyridylmethyl)-amin, N,N'-(Bis-(1-methylimidazol-2-yl)-methyl)-ethylendiamin, N-Bis-(2-benzimidazolylmethyl)-aminoethanol, 2,6-Bis-(bis-(2-benzimidazolylmethyl)aminomethyl)-4-methylphenol, N,N,N',N'-Tetrakis-(2-benzimidazolylmethyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropan, 2,6-Bis-(bis-(2-pyridylmethyl)aminomethyl)-4-methylphenol, 1,3-Bis-(bis-(2-benzimidazolylmethyl)aminomethyl)-benzol, Sorbitol, Mannitol, Erythritol, Adonitol, Inositol, Lactose, und gegebenenfalls substituierte Salene, Porphine und Porphyrine gehören. Zu den anorganischen Neutralliganden gehören insbesondere Ammoniak und Wasser. Falls nicht sämtliche Koordinationsstellen des Übergangsmetallzentralatoms durch Neutralliganden besetzt sind, enthält der Komplex weitere, vorzugsweise anionische und unter diesen insbesondere ein- oder zweizählige Liganden. Zu diesen gehören insbesondere die Halogenide wie Fluorid, Chlorid, Bromid und Iodid, und die (NO₂)-Gruppe, das heißt ein Nitro-Ligand oder ein Nitrito-Ligand. Die (NO₂)-Gruppe kann an ein Übergangsmetall auch chelatbildend gebunden sein oder sie kann zwei Übergangsmetallatome asymmetrisch oder η¹-O-verbrücken. Außer den genannten Liganden können die Übergangsmetallkomplexe noch weitere, in der Regel einfacher aufgebaute Liganden, insbesondere ein- oder mehrwertige Anionliganden, tragen. In Frage kommen beispielsweise Nitrat, Actetat, Trifluoracetat, Formiat, Carbonat, Citrat, Oxalat, Perchlorat sowie komplexe Anionen wie Hexafluorophosphat. Die Anionliganden sollen für den Ladungsausgleich zwischen Übergangsmetall-Zentralatom und dem Ligandensystem sorgen. Auch die Anwesenheit von Oxo-Liganden, Peroxo-Liganden und Imino-Liganden ist möglich. Insbesondere derartige Liganden können auch verbrückend wirken, so daß mehrkernige Komplexe entstehen. Im Falle verbrückter, zweikerniger Komplexe müssen nicht beide Metallatome im Komplex gleich sein. Auch der Einsatz zweikerniger Komplexe, in denen die beiden Übergangsmetallzentralatome unterschiedliche Oxidationszahlen aufweisen, ist möglich. Falls Anionliganden fehlen oder die Anwesenheit von Anionliganden nicht zum Ladungsausgleich im Komplex führt, sind in den gemäß der Erfindung zu verwendenden Übergangsmetallkomplex-Verbindungen anionische Gegenionen anwesend, die den kationischen Übergangsmetall-Komplex neutralisieren. Zu diesen anionischen Gegenionen gehören insbesondere Nitrat, Hydroxid, Hexafluorophosphat, Sulfat, Chlorat, Perchlorat, die Halogenide wie Chlorid oder die Anionen von Carbonsäuren wie Formiat, Acetat, Oxalat, Benzoat oder Citrat. Beispiele für einsetzbare Übergangsmetallkomplex-Verbindungen sind Mn(IV)₂(μ-O)₃(1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyclononan)-di-hexafluorophosphat, [N,N'-Bis[(2-hydroxy-5-vinylphenyl)-methylen]-1,2-diaminocyclohexan]-mangan-(III)-chlorid, [N,N'-Bis[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)-methylen]-1,2-diaminocyclohexan]-mangan-(III)-acetat, [N,N'-Bis[(2-hydroxyphenyl)-methylen]-1,2-phenylendiamin]-mangan-(III)-acetat, [N,N'-Bis[(2-hydroxyphenyl)-methylen]-1,2-diaminocyclohexan]-mangan-(III)-chlorid, [N,N'-Bis[(2-hydroxyphenyl)-methylen]-1,2-diaminoethan]-mangan-(III)-chlorid, [N,N'-Bis[(2-hydroxy-5-sulfonatophenyl)-methylen]-1,2-diaminoethan]-mangan-(III)-chlorid, Mangan-oxalatokomplexe, Nitropentammin-cobalt(III)-chlorid, Nitritopentammin-cobalt(III)-chlorid, Hexammincobalt(III)-chlorid, Chloropentammin-cobalt(III)-chlorid sowie der Peroxo-Komplex [(NH₃)₅Co-O-O-Co(NH₃)₅]Cl₄.

[0058] Als in den Mitteln zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Laccasen verwendbare Enzyme kommen solche aus der Klasse der Amylasen, Proteasen, Lipasen, Cutinasen, Pullulasen, Hemicellulasen, Cellulasen, Oxidasen und Peroxidasen sowie deren Gemische in Frage. Auch der Einsatz einer oder mehrerer weiterer Laccasen bzw. Multi-Kupfer-Oxidasen zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Laccasen ist erfindungsgemäß möglich. Besonders geeignet sind aus Pilzen oder Bakterien, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Streptomyces griseus*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola insolens*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas cepacia* oder *Coprinus cinereus* gewonnene enzymatische Wirkstoffe. Die Enzyme können an Trägerstoffen adsorbiert und/oder in Hüllsubstanzen eingebettet sein, um sie gegen vorzeitige Inaktivierung zu schützen. Sie sind in den erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmitteln vorzugsweise in Mengen bis zu 5 Gew.-%, insbesondere von 0,2 Gew.-% bis 4 Gew.-%, enthalten. Falls das erfindungsgemäße Mittel Protease enthält, weist es vorzugsweise eine proteolytische Aktivität im Bereich von etwa 100 PE/g bis etwa 10000 PE/g, insbesondere 300 PE/g bis 8000 PE/g auf. Falls mehrere Enzyme in dem erfindungsgemäßen Mittel eingesetzt werden sollen, kann dies durch Einarbeitung der zwei oder mehreren separaten beziehungsweise in bekannter Weise separat konfektionierten Enzyme oder durch zwei oder mehrere gemeinsam in einem Granulat konfektionierte Enzyme durchgeführt werden.

[0059] Zu den in den Waschmitteln, insbesondere wenn sie in flüssiger oder pastöser Form vorliegen, neben Wasser verwendbaren organischen Lösungsmitteln gehören Alkohole mit 1 bis 4 C-Atomen, insbesondere Methanol, Ethanol, Isopropanol und tert.-Butanol, Diole mit 2 bis 4 C-Atomen, insbesondere Ethylenglykol und Propylenglykol, sowie deren Gemische und die aus den genannten Verbindungsklassen ableitbaren Ether. Derartige wassermischbare Lösungsmittel sind in den erfindungsgemäßen Mitteln vorzugsweise in Mengen nicht über 30 Gew.-%, insbesondere von 6 Gew.-% bis 20 Gew.-%, vorhanden.

[0060] Zur Einstellung eines gewünschten, sich durch die Mischung der übrigen Komponenten nicht von selbst ergebenden pH-Werts können die erfindungsgemäßen Mittel system- und umweltverträgliche Säuren, insbesondere Citronensäure, Essigsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Glykolsäure, Bernsteinsäure, Glutar-

säure und/oder Adipinsäure, aber auch Mineralsäuren, insbesondere Schwefelsäure, oder Basen, insbesondere Ammonium- oder Alkalihydroxide, enthalten. Derartige pH-Regulatoren sind in den erfindungsgemäßen Mitteln in Mengen von vorzugsweise nicht über 20 Gew.-%, insbesondere von 1,2 Gew.-% bis 17 Gew.-%, enthalten.

[0061] Vergrauungsinhibitoren haben die Aufgabe, den von der Textilfaser abgelösten Schmutz in der Flotte suspendiert zu halten. Hierzu sind wasserlösliche Kolloide meist organischer Natur geeignet, beispielsweise Stärke, Leim, Gelatine, Salze von Ethercarbonsäuren oder Ethersulfonsäuren der Stärke oder der Cellulose oder Salze von sauren Schwefelsäureestern der Cellulose oder der Stärke. Auch wasserlösliche, saure Gruppen enthaltende Polyamide sind für diesen Zweck geeignet. Weiterhin lassen sich andere als die obengenannten Stärkederivate verwenden, zum Beispiel Aldehydstärken. Bevorzugt werden Celluloseether, wie Carboxymethylcellulose (Na-Salz), Methylcellulose, Hydroxyalkylcellulose und Mischether, wie Methylhydroxyethylcellulose, Methylhydroxypropylcellulose, Methylcarboxymethylcellulose und deren Gemische, beispielsweise in Mengen von 0,1 bis 5 Gew.-%, bezogen auf die Mittel, eingesetzt.

[0062] Waschmittel können als optische Aufheller beispielsweise Derivate der Diaminostilbendisulfonsäure beziehungsweise deren Alkalimetallsalze enthalten, obgleich sie für den Einsatz als Colorwaschmittel vorzugsweise frei von optischen Aufhellern sind. Geeignet sind zum Beispiel Salze der 4,4'-Bis(2-anilino-4-morpholino-1,3,5-triazinyl-6-amino)stilben-2,2'-disulfonsäure oder gleichartig aufgebaute Verbindungen, die anstelle der Morpholino-Gruppe eine Diethanolaminogruppe, eine Methylaminogruppe, eine Anilinogruppe oder eine 2-Methoxyethylaminogruppe tragen. Weiterhin können Aufheller vom Typ der substituierten Diphenylstyryle anwesend sein, zum Beispiel die Alkalisalze des 4,4'-Bis(2-sulfostyryl)-diphenyls, 4,4'-Bis(4-chlor-3-sulfostyryl)-diphenyls, oder 4-(4-Chlorstyryl)-4'-(2-sulfostyryl)-diphenyls. Auch Gemische der vorgenannten optischen Aufheller können verwendet werden.

[0063] Insbesondere beim Einsatz in maschinellen Verfahren kann es von Vorteil sein, den Mitteln übliche Schauminhibitoren zuzusetzen. Als Schauminhibitoren eignen sich beispielsweise Seifen natürlicher oder synthetischer Herkunft, die einen hohen Anteil an C₁₈-C₂₄-Fettsäuren aufweisen. Geeignete nichttensidartige Schauminhibitoren sind beispielsweise Organopolysiloxane und deren Gemische mit mikrofeiner, gegebenenfalls silanierter Kieselsäure sowie Paraffine, Wachse, Mikrokristallinwachse und deren Gemische mit silanierter Kieselsäure oder Bisfettsäurealkylendiamiden. Mit Vorteilen werden auch Gemische aus verschiedenen Schauminhibitoren verwendet, zum Beispiel solche aus Silikonem, Paraffinen oder Wachsen. Vorzugsweise sind die Schauminhibitoren, insbesondere Silikon- und/oder Paraffin-haltige Schauminhibitoren, an eine granulare, in Wasser lösliche beziehungsweise dispergierbare Trägersubstanz gebunden. Insbesondere sind dabei Mischungen aus Paraffinen und Bistearylethylendiamid bevorzugt.

[0064] Die Herstellung fester Mittel bietet keine Schwierigkeiten und kann auf bekannte Weise, zum Beispiel durch Sprühtrocknen oder Granulation, erfolgen, wobei Enzyme und eventuelle weitere thermisch empfindliche Inhaltsstoffe wie zum Beispiel Bleichmittel gegebenenfalls später separat zugesetzt werden. Zur Herstellung von Mitteln mit erhöhtem Schüttgewicht, insbesondere im Bereich von 650 g/l bis 950 g/l, ist ein Extrusionsschritt aufweisendes Verfahren bevorzugt.

[0065] Zur Herstellung von Mitteln in Tablettenform, die einphasig oder mehrphasig, einfarbig oder mehrfarbig und insbesondere aus einer Schicht oder aus mehreren, insbesondere aus zwei Schichten bestehen können, geht man vorzugsweise derart vor, dass man alle Bestandteile – gegebenenfalls je einer Schicht – in einem Mischer miteinander vermischt und das Gemisch mittels herkömmlicher Tablettenpressen, beispielsweise Exzenterpressen oder Rundläuferpressen, mit Preßkräften im Bereich von etwa 50 bis 100 kN, vorzugsweise bei 60 bis 70 kN verpreßt. Insbesondere bei mehrschichtigen Tabletten kann es von Vorteil sein, wenn mindestens eine Schicht vorverpreßt wird. Dies wird vorzugsweise bei Preßkräften zwischen 5 und 20 kN, insbesondere bei 10 bis 15 kN durchgeführt. Man erhält so problemlos bruchfeste und dennoch unter Anwendungsbedingungen ausreichend schnell lösliche Tabletten mit Bruch- und Biegefestigkeiten von normalerweise 100 bis 200 N, bevorzugt jedoch über 150 N. Vorzugsweise weist eine derart hergestellte Tablette ein Gewicht von 10 g bis 50 g, insbesondere von 15 g bis 40 g auf. Die Raumform der Tabletten ist beliebig und kann rund, oval oder eckig sein, wobei auch Zwischenformen möglich sind. Ecken und Kanten sind vorteilhafterweise abgerundet. Runde Tabletten weisen vorzugsweise einen Durchmesser von 30 mm bis 40 mm auf. Insbesondere die Größe von eckig oder quaderförmig gestalteten Tabletten, welche überwiegend über die Dosiervorrichtung der Waschmaschine eingebracht werden, ist abhängig von der Geometrie und dem Volumen dieser Dosiervorrichtung. Beispielhaft bevorzugte Ausführungsformen weisen eine Grundfläche von (20 bis 30 mm) × (34 bis 40 mm), insbesondere von 26 × 36 mm oder von 24 × 38 mm auf.

[0066] Flüssige beziehungsweise pastöse Mittel in Form von übliche Lösungsmittel enthaltenden Lösungen werden in der Regel durch einfaches Mischen der Inhaltsstoffe, die in Substanz oder als Lösung in einen automatischen Mischer gegeben werden können, hergestellt.

[0067] Erfindungsgemäße feste und/oder flüssige Waschmittel können z. B. auch in Portions-Säckchen oder (vorzugsweise selbstauflösenden) Portionsbeuteln (pouches) abgepackt sein, insbesondere auch in Mehrkammerpouches. Unter den Begriff der Flüssigkeit fallen im Sinne der Erfindung auch jegliche Festkörperdispersionen in Flüssigkeiten. Erfindungsgemäße flüssige Mittel können auch mehrphasig sein, die Phasen können z. B. vertikal, also übereinander oder horizontal, also nebeneinander angeordnet sein.

Beispiele:

[0068] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch darauf einzuschränken:

Beispiel 1:

Aktivitätsbestimmung der Laccase mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1:

[0069] Die Bestimmung der Enzymaktivität der Laccase erfolgte fotometrisch. Hierfür wurde als Laccasesubstrat das Anthocyanin Primulin (Malvidin-3-galactoside chloride, CAS Number: 30113-37-2) verwendet.

[0070] Die Absorption wurde in einem Synergy 2™ microplate reader (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany) gemessen. Die Substratlösung bestand aus Puffer (0.1 M NaAc; 0.1 M Kaliumphosphat, pH 8) und 31 mmol Primulin (Sigma). 50 µL der Laccaseprobe wurden zu 100 µL Substratlösung in eine Mikrotiterplatte gegeben und die Absorptionsabnahme über 30 Minuten bei 30 °C als -mAbs/min gemessen. Vergleichsproben wurden mit Wasser anstelle der Laccaseprobe hergestellt. Umrechnung in Units:

Umrechnung in Units:

[0071] Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte an Hand der Formel:

Aktivität [mU/mL] = (Gesamtvolumen im Assay in µL · Steigung pro min) / (Probenvolumen im Assay in mL · 16000 L/mol/cm · Schichtdicke in cm)

[0072] Die Schichtdicke mit 150 µL Füllmenge in den Mikrotiterplatten betrug 0,425 cm. Der Assay wurde mit 100 µL Substratlösung und 50 µL Probe durchgeführt. Die negative Steigung (-Abs/min) wurde dann positiv gesetzt.

[0073] Die Enzymprobe des Trametes species (Tsp, DSMZ 11309) aufgereinigten Wildtypüberstandes zeigt eine Aktivität von -29,5 mAbs/min und somit 13 mU/mL.

Beispiel 2:

[0074] Ein erster Mini-Waschtest erfolgte mit dem aufgereinigten Wildtyp-Überstand aus Trametes species (Tsp, DSMZ 11309), in dem die Laccase mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 vorliegt. Die Testbedingungen waren wie folgt: 40°C, 16°dH Wasser, 1 h, Laccasekonzentration: 1 mU/mL

[0075] Für dieses Beispiel wurden standardisiert verschmutzte Textilien eingesetzt. Es wurden folgende Anschmutzungen verwendet:

- Johannisbeere CS12 [CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande]
- Blaubeere CS15 [CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande]
- Tee EMPA 167 [EMPA: Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG [Federal materials and testing agency, Testmaterials], St. Gallen, Switzerland]

[0076] Die ausgestanzten Gewebe (Durchmesser = 10 mm) wurden in Mikrotiterplatten vorlegt, die Waschlauge wurde auf 40°C vortemperiert, Die Endkonzentration der Waschmatrix betrug 4,06 g/L in 16°dH Wasser. Dann wurden Lauge und Enzym auf die Anschmutzung gegeben, gefolgt von einer Inkubation für 1 h bei 40°C und 600 rpm. Abschließend wurde die Anschmutzung mehrmals mit klarem Wasser gespült, trocknen gelassen und die Helligkeit wurde mit einem Minolta Farbmeßgerät Cm700d (CIE L*a*b*, D65/10°/SCI) bestimmt. Die Reinigungsleistung zeigte sich in diesem Beispiel an der Helligkeit des gewaschenen Gewebes. Je heller das

Gewebe wurde, desto besser war die Reinigungsleistung. Gemessen wurde hier der L-Wert = Helligkeit, je höher desto heller. Es wurde mit einem Flüssigwaschmittel gewaschen, das keine Enzyme, optische Aufheller und Farbstoffe enthielt, um die biochem. Assays nicht zu stören. Die Rezeptur ist in Beispiel 3 angegeben.

Probe 1: nur Waschmittel als Benchmark

Probe 2: Waschmittel plus Laccase aus *Trametes species* (Tsp, DSMZ 11309), 1 mU/mL

Probe 3: Waschmittel plus Laccase aus *Pleurotus ostreatus* (Sigma), 1 mU/mL

Ergebnis (Probe 1 vs. Probe 2):

Anschmutzung	Probe 1	Probe 2
Johannisbeere	74,8	79,7
Blaubeere	73,3	74,0
Tee	73,8	75,1

[0077] Man erkennt deutlich, dass die Laccase auf beiden Anthocyan-haltigen Anschmutzungen (Johannisbeere und Blaubeere) eine gute Leistung zeigt. Der Teefleck wurde nicht nur nicht verdunkelt, wie dies von anderen Laccasen bekannt ist, er wurde sogar vorteilhafterweise deutlich aufgehellt.

[0078] Von einer signifikanten Leistungsverbesserung kann bereits ab 1 Einheit gesprochen werden; hier wurden sogar 4,9 Einheiten Verbesserung erzielt.

[0079] Als Negativkontrolle wurde eine käufliche Laccase aus *Pleurotus ostreatus* auf gleichem Aktivitätslevel eingesetzt wie die Laccase in Probe 2.

Ergebnis (Probe 1 vs. Probe 3):

Anschmutzung	Probe 1	Probe 3
Johannisbeere	76,8	77,7
Blaubeere	76,4	75,7
Tee	75,1	74,8

[0080] Die Waschleistung der Probe 3 ist gegenüber Probe 1 erkennbar nicht verbessert.

Beispiel 3:

Waschmittelformulierung:

[0081] Diese Rezeptur wurde in Beispiel 2 benutzt. Die Dosierung betrug 69g/17L:

Chemical name	% AM (raw material)	% Active Matter in formula
Wasser demin.	100	Rest
Alkylbenzolsulfonsäure	96	4,40
Anionisches Tensid	70	5,60
C12-C18 Fettsäure Na-Salz	100	2,40
Nonionisches Tensid	100	4,40
Phosphonat	32	0,20
Zitronensäure	100	1,43
NaOH	50	0,95
Antischaum	10	0,01

Glycerin	99,5	2,00
Konservierungsmittel	100	0,08
Ethanol	93	1,00

Ohne opt. Aufheller, Parfüm, Farbstoff und Enzyme.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403–410 [0015]
- Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389–3402 [0015]
- Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497–3500 [0015]
- Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205–217 [0015]
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3. Edition Cold Spring Laboratory Press [0020]

Patentansprüche

1. Laccase, umfassend eine Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 70% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% und 99% identisch ist.
2. Laccase, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Nukleinsäuresequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 70% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% und 99% identisch ist.
3. Waschmittel, enthaltend mindestens eine Laccase nach Anspruch 1 oder 2.
4. Waschmittel nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration der mindestens einen Laccase von 0,001 bis 0,15 Gew.-%, vorzugsweise von 0,005 bis 0,06 Gew.-%, bezogen auf aktives Protein beträgt.
5. Waschmittel nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß es vorzugsweise im Temperaturbereich von 5°C bis 95°C, bevorzugt 20°C bis 60°C und besonders bevorzugt 30°C bis 40°C einsetzbar ist.
6. Waschmittel nach einem der Ansprüche 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zusätzliche Mediatoren enthält, die ausgewählt sind unter 2,2,6,6-Tetramethyl-1-Piperidinyloxy, 1-Hydroxybenzotriazol, 2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzthiazol-6-Sulphonat, N-Hydroxy-Acetanilid, 2,5-Xylidin, Ethanol, Kupfer, 4-Methylcatechol, N-Hydroxyphthalimid, Gallussäure, Gerbsäure, Quercetin, Syringasäure, Guaiacol, Dimethoxybenzyl alcohol, Phenol, Violursäure, Phenolrot, Bromphenolblau, Cellulose, p-Kumarinsäure, Rooibos, o-Kresol, Dichlorodiphenol, Hydroxybenzotriazol, Cycloheximid oder Vanillin.
7. Verwendung einer Laccase nach Anspruch 1 oder 2 zur Verbesserung der Waschleistung eines Waschmittels, insbesondere bei der Entfernung farbiger Flecken und Verschmutzungen, besonders bevorzugt bei der Entfernung Anthocyan-haltiger Verschmutzungen. Verfahren zum Waschen von Textilien in tensidhaltigen wäßrigen Lösungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine tensidhaltige wäßrige Lösung einsetzt, die mindestens eine Laccase nach Anspruch 1 oder 2 enthält.

Es folgen keine Zeichnungen