



(11)

EP 2 727 989 B2

(12)

NEUE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

Nach dem Einspruchsverfahren

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Entscheidung über den Einspruch:
21.12.2022 Patentblatt 2022/51

(51) Internationale Patentklassifikation (IPC):
C11D 3/386 (2006.01) **C11D 3/38** (2006.01)
C11D 3/33 (2006.01) **C11D 3/37** (2006.01)
C11D 3/20 (2006.01) **C11D 3/22** (2006.01)

(45) Hinweis auf die Patenterteilung:
26.06.2019 Patentblatt 2019/26

(52) Gemeinsame Patentklassifikation (CPC):

C11D 3/3869; C11D 1/32; C11D 3/2003;
C11D 3/201; C11D 3/2041; C11D 3/2044;
C11D 3/2065; C11D 3/2072; C11D 3/2075;
C11D 3/2079; C11D 3/2082; C11D 3/2086;
C11D 3/221; C11D 3/222; C11D 3/33; (Forts.)

(21) Anmeldenummer: **14152970.1**

(22) Anmeldetag: **10.07.2009**

(54) Verfahren zur Verbesserung der Reinigungsleistung eines Wasch- und Reinigungsmittels

Method for improving the cleaning performance of a washing and cleaning agent

Procédé d'amélioration de la puissance de nettoyage d'un produit de lavage et de nettoyage

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL
PT RO SE SI SK SM TR

- Weber, Thomas**
41541 Dormagen (DE)
- Maurer, Karl-Heinz**
40699 Erkrath (DE)
- Bessler, Cornelius**
40231 Düsseldorf (DE)

(30) Priorität: **20.08.2008 DE 102008038479**

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 0 583 534 **EP-A- 2 083 067**
WO-A-96/22352 **WO-A-98/13459**
WO-A-98/17770 **WO-A1-91/09929**
DE-A1- 1 942 236 **DE-A1- 1 964 792**
DE-A1- 2 038 103 **DE-A1- 2 060 485**
DE-A1- 2 709 476 **DE-A1- 19 953 057**
DE-T2- 60 208 777 **JP-A- 11 323 392**
US-A- 3 707 505 **US-A- 4 305 837**
US-A- 6 165 970

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
07.05.2014 Patentblatt 2014/19

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en) nach Art. 76 EPÜ:
09780407.4 / 2 313 482

(73) Patentinhaber: **Henkel AG & Co. KGaA**
40589 Düsseldorf (DE)

(72) Erfinder:

- O'Connell, Timothy**
40547 Düsseldorf (DE)
- Siegert, Petra**
42781 Haan (DE)
- Evers, Stefan**
42781 Haan (DE)
- Bongaerts, Johannes**
41541 Dormagen (DE)

(52) Gemeinsame Patentklassifikation (CPC): (Forts.)
C11D 3/3719; C11D 3/3723; C11D 3/3753;
C11D 3/3757; C11D 3/3769; C11D 3/381;
C11D 3/386; C11D 3/38627; C11D 3/38636;
C11D 3/38645

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Anmeldung richtet sich auf Verwendung eines mikrobiellen Metabolits zur Steigerung der Reinigungsleistung einer Protease in einem Wasch- oder Reinigungsprozess.

5 **[0002]** Der Einsatz von Enzymen in Wasch- und Reinigungsmitteln ist im Stand der Technik etabliert. Sie dienen dazu, das Leistungsspektrum der betreffenden Mittel entsprechend ihren speziellen Aktivitäten zu erweitern. Hierzu gehören insbesondere hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Amylasen, Lipasen und Cellulasen. Die ersten drei genannten hydrolyseren Proteine, Stärke und Fette und tragen somit unmittelbar zur Schmutzentfernung bei. Cellulasen werden insbesondere wegen ihrer Gewebewirkung eingesetzt. Eine weitere Gruppe von Wasch- und Reinigungsmittelenzymen 10 sind oxidative Enzyme, insbesondere Oxidasen, die ggf. im Zusammenspiel mit anderen Komponenten vorzugsweise dazu dienen, Anschmutzungen zu bleichen oder die bleichenden Agentien *in situ* zu erzeugen. Neben diesen Enzymen, die einer fortwährenden Optimierung unterworfen werden, werden laufend weitere Enzyme für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln bereitgestellt, um insbesondere spezielle Anschmutzungen optimal angehen zu können, wie 15 beispielsweise Pektininasen, β -Glucaninasen, Mannaninasen oder weitere Hemicellulasen zur Hydrolyse insbesondere spezieller pflanzlicher Polymere.

20 **[0003]** Die am längsten etablierten und in praktisch allen modernen, leistungsfähigen Wasch- und Reinigungsmitteln enthaltenen Enzyme sind Proteasen und hierunter insbesondere Serin-Proteasen, zu denen auch die Subtilasen zählen. Sie bewirken den Abbau proteinhaltiger Anschmutzungen auf dem Reinigungsgut. Hierunter sind wiederum Proteasen vom Subtilisin-Typ (Subtilasen, Subtilopeptidasen, EC 3.4.21.62) besonders wichtig, welche aufgrund der katalytisch 25 wirksamen Aminosäuren den Serin-Proteasen zugerechnet werden. Sie wirken als unspezifische Endopeptidasen, das heißt, sie hydrolyseren beliebige Säureamidbindungen, die im Inneren von Peptiden oder Proteinen liegen. Ihr pH-Optimum liegt meist im deutlich alkalischen Bereich. Einen Überblick über diese Familie bietet beispielsweise der Artikel "Subtilases: Subtilisin-like Proteases" von R. Siezen, Seite 75-95 in "Subtilisin enzymes", herausgegeben von R. Bott und C. Betzel, New York, 1996. Subtilasen werden natürlicherweise von Mikroorganismen gebildet; hierunter sind insbesondere die von *Bacillus*-Spezies gebildeten und sekretierten Subtilisine als bedeutendste Gruppe innerhalb der Subtilasen zu erwähnen.

30 **[0004]** Beispiele für die in Wasch- und Reinigungsmitteln bevorzugt eingesetzten Proteasen vom Subtilisin-Typ sind die Subtilisine BPN' und Carlsberg, die Protease PB92, die Subtilisine 147 und 309, die alkalische Protease aus *Bacillus latus*, insbesondere aus *Bacillus latus* DSM 5483, Subtilisin DY und die den Subtilasen, nicht mehr jedoch den Subtilisinen im engeren Sinne zuzuordnenden Enzyme Thermitase, Proteinase K und die Proteasen TW3 und TW7. Weitere verwendbare Proteasen sind beispielsweise die unter den Handelsnamen Durazym®, Relase®, Everlase®, 35 Nafizym, Natalase®, Kannase® und Ovozyme® von der Firma Novozymes, die unter den Handelsnamen, Purafect®, Purafect® OXP, Purafect® Prime und Properase® von der Firma Genencor, das unter dem Handelsnamen Protosol® von der Firma Advanced Biochemicals Ltd., Thane, Indien, das unter dem Handelsnamen Wuxi® von der Firma Wuxi 40 Snyder Bioproducts Ltd., China, die unter den Handelsnamen Proleather® und Protease P® von der Firma Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japan, und das unter der Bezeichnung Proteinase K-16 von der Firma Kao Corp., Tokyo, Japan, erhältlichen Enzyme.

45 **[0005]** Günstigenfalls ergeben sich Synergieeffekte zwischen den Enzymen und den übrigen Bestandteilen der jeweiligen Wasch- oder Reinigungsmittel.

50 **[0006]** Ein Nachteil dieser bevorzugt in Wasch- und Reinigungsmitteln eingesetzten Proteasen aus dem Stand der Technik ist, dass sie insbesondere bei niedrigen Temperaturen, beispielsweise zwischen 10°C und 40°C, insbesondere zwischen 10°C und 30°C oder gar zwischen 10°C und 25°C, keine zufrieden stellende proteolytische Aktivität aufweisen und daher insbesondere in Waschmitteln und Geschirrspülmitteln in diesem Temperaturbereich keine optimale Reinigungsleistung zeigen.

55 **[0007]** Aus DE 19953057 A1 sind enzymhaltige höherviskose Flüssigwaschmittel mit Proteasen und aus US 4305837 sind wässrige Enzymzusammensetzungen mit verbesserter Lagerstabilität bekannt.

[0008] Überraschenderweise wurde festgestellt, dass der Zusatz bestimmter Substanzen die Reinigungsleistung von Wasch- und Reinigungsmitteln, welche Proteasen enthalten, erheblich verbessert, insbesondere bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen, insbesondere zwischen 10°C und 50°C, zwischen 10°C und 40°C und bevorzugt zwischen 10°C und 30°C bzw. 10°C und 25°C.

60 **[0009]** Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die Reinigungsleistung (Waschkraft) von Wasch- oder Reinigungsmitteln zu verbessern hinsichtlich Anschmutzungen, die sensiv sind für den Abbau durch Proteasen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, die Reinigungsleistung von Proteasen, in Wasch- oder Reinigungsmitteln bzw. der durch die Wasch- bzw. Reinigungsmittel gebildeten Waschflotte zu verbessern hinsichtlich Anschmutzungen, die sensiv sind für den Abbau durch Proteasen, und insbesondere in einem Temperaturbereich zwischen 10°C und 50°C, zwischen 10°C und 40°C und bevorzugt zwischen 10°C und 30°C bzw. 10°C und 25°C.

65 **[0010]** Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung eines mikrobiellen Metabolits zur Steigerung der Reinigungsleistung einer Protease in einem Wasch- oder Reinigungsprozess, dadurch gekennzeichnet, dass der mikrobielle

Metabolit aus der aus 2,3-Butandiol, Pyruvat, Propionat, Butyrat und Levan bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

[0011] Erfnungsgemäß wurde festgestellt, dass die Reinigungsleistung von Wasch- oder Reinigungsmitteln, insbesondere hinsichtlich ihrer proteolytischen Reinigungsleistung signifikant verbessert wird, wenn in diesen Mitteln mindestens eine Protease (hierin auch bezeichnet als Komponente (a) bzw. hydrolytisches Enzym (a)) mit einem mikrobiellen

5 Metaboliten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 2,3-Butandiol, Pyruvat, Propionat und Levan (hierin auch bezeichnet als Komponente (b)), kombiniert wird. Unter Reinigungsleistung wird im Rahmen der Erfindung die Aufhellungsleistung an einer oder mehreren Anschmutzungen, insbesondere Wäscheanschmutzungen, verstanden, die sensibel sind für den Abbau durch Proteasen. Beispiele für solche Anschmutzungen sind Blut-Milch/Tusche auf Baumwolle, Voll-Ei/Pigment auf Baumwolle, Schokolade-Milch/Tusche auf Baumwolle, Erdnuss Öl-Pigment/Tusche auf Polyester/Baumwolle, Gras auf Baumwolle oder Kakao auf Baumwolle, insbesondere derart wie weiter unten angegeben. Im Rahmen der Erfindung weist sowohl das Wasch- oder Reinigungsmittel, welches die Protease umfasst, bzw. die durch dieses Mittel gebildete Wasch- bzw. Reinigungsflotte, als auch die Protease selbst eine jeweilige Reinigungsleistung auf. Die Reinigungsleistung der Protease trägt somit zur Reinigungsleistung des Mittels bzw. der durch das Mittel gebildeten Wasch- bzw. Reinigungsflotte bei.

10 [0012] Die Reinigungsleistung von Wasch- und Reinigungsmitteln bezogen auf die eingesetzte proteolytische Aktivität wird durch den Zusatz der Komponente (b) verbessert. Hinsichtlich des Zusammenwirkens von diesen Komponenten (a) und (b) ergibt sich eine synergistische Wirkung, d.h. eine bessere Leistung im Vergleich mit den Einzelleistungen der jeweiligen Komponente in Ein-Komponenten-Systemen (d.h. Wasch- oder Reinigungsmittel, die nur jeweils das proteolytische Enzym bzw. die Komponente (b) enthalten) und auch gegenüber der Summe der Einzelleistungen der

15 Komponenten (a) und (b), d.h. der Summe von zwei Ein-Komponenten-Systemen mit jeweils der Komponente (a) und (b) alleine. Somit stellt die ausgewählte Kombination von (a) Protease mit einer erfungsgemäßen Komponente (b) eine weitere Möglichkeit dar, um die Leistungsfähigkeit von Wasch- oder Reinigungsmitteln hinsichtlich ihrer Reinigungsleistung, insbesondere hinsichtlich ihrer Reinigungsleistung, die durch eine enthaltene Protease bewirkt wird, zu verbessern.

20 [0013] Die Vorteilhaftigkeit der Kombination der Komponenten (a) und (b) liegt bei Anwendung des Mittels vor, d.h. in der Wasch- bzw. Reinigungsflotte. Unter Wasch- bzw. Reinigungsflotte wird diejenige das Wasch- oder Reinigungsmittel enthaltende Gebrauchslösung verstanden, die auf Textilien oder Gewebe (Waschflotte) bzw. harte Oberflächen (Reinigungsflotte) einwirkt und damit mit den auf Textilien bzw. Geweben oder harten Oberflächen vorhandenen Anschmutzungen in Kontakt kommt. Üblicherweise entsteht die Wasch- bzw. Reinigungsflotte, wenn der Wasch- oder Reinigungsvorgang beginnt und das Wasch- oder Reinigungsmittel beispielsweise in einer Waschmaschine oder in einem anderen geeigneten Behältnis in Wasser gelöst bzw. mit Wasser verdünnt wird.

25 [0014] Weitere bevorzugt zusätzlich zu Proteasen einsetzbare hydrolytische Enzyme umfassen Amylasen, insbesondere α -Amylasen, Cellulasen, Lipasen, Hemicellulasen, insbesondere Pectinasen, Mannanasen, β -Glucanases, sowie deren Gemische. Diese Enzyme sind im Prinzip natürlichen Ursprungs; ausgehend von den natürlichen Molekülen 30 stehen für den Einsatz in Wasch- oder Reinigungsmitteln verbesserte Varianten zur Verfügung, die entsprechend bevorzugt eingesetzt werden.

35 [0015] Unter den Proteasen sind solche vom Subtilisin-Typ bevorzugt. Beispiele hierfür sind die Subtilisine BPN' und Carlsberg, die Protease PB92, die Subtilisine 147 und 309, die Alkalische Protease aus *Bacillus latus*, Subtilisin DY und die den Subtilasen, nicht mehr jedoch den Subtilisinen im engeren Sinne zuzuordnenden Enzyme Thermitase, Proteinase K und die Proteasen TW3 und TW7. Subtilisin Carlsberg ist in weiterentwickelter Form unter dem Handelsnamen Alcalase[®] von der Firma Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark, erhältlich. Die Subtilisine 147 und 309 werden 40 unter den Handelsnamen Esperase[®], beziehungsweise Savinase[®] von der Firma Novozymes vertrieben. Von der Protease aus *Bacillus latus* DSM 5483 leiten sich die unter der Bezeichnung BLAP[®] geführten Protease-Varianten ab. Weitere brauchbare Proteasen sind beispielsweise die unter den Handelsnamen Durazym[®], Relase[®], Everlase[®], Nafizym[®], Natalase[®], Kannase[®] und Ovozyme[®] von der Firma Novozymes, die unter den Handelsnamen, Purafect[®], Purafect[®] OxP, Purafect[®] Prime, Excellase[®] und Properase[®] von der Firma Genencor, das unter dem Handelsnamen Protosol[®] von der Firma Advanced Biochemicals Ltd., Thane, Indien, das unter dem Handelsnamen Wuxi[®] von der Firma Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, die unter den Handelsnamen Proleather[®] und Protease P[®] von der Firma 45 Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japan, und das unter der Bezeichnung Proteinase K-16 von der Firma Kao Corp., Tokyo, Japan, erhältlichen Enzyme. Besonders bevorzugt eingesetzt werden auch die Proteasen aus *Bacillus gibsonii* und *Bacillus pumilus*, die offenbar sind in den internationalen Patentanmeldungen WO2008/086916 und WO2007/131656.

50 [0016] Beispiele für verwendbare Amylasen sind die α -Amylasen aus *Bacillus licheniformis*, aus *B. amyloliquefaciens* oder aus *B. stearothermophilus* sowie deren für den Einsatz in Wasch- oder Reinigungsmitteln verbesserte Weiterentwicklungen. Das Enzym aus *B. licheniformis* ist von der Firma Novozymes unter dem Namen Termamyl[®] und von der Firma Genencor unter dem Namen Purastar[®] ST erhältlich. Weiterentwicklungsprodukte dieser α -Amylase sind von der Firma Novozymes unter den Handelsnamen Duramyl[®] und Termamyl[®] ultra, von der Firma Genencor unter dem Namen Purastar[®] OxAm und von der Firma Daiwa Seiko Inc., Tokyo, Japan, als Keistase[®] erhältlich. Die α -Amylase von *B.*

amyloliquefaciens wird von der Firma Novozymes unter dem Namen BAN® vertrieben, und abgeleitete Varianten von der α -Amylase aus *B. stearothermophilus* unter den Namen BSG® und Novamyl®, ebenfalls von der Firma Novozymes. Des Weiteren sind für diesen Zweck die α -Amylase aus *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) und die Cyclodextrin-Glucano-transferase (CGTase) aus *B. agaradherens* (DSM 9948) hervorzuheben. Ferner sind die amylolytischen Enzyme einsetzbar, die dem Sequenzraum von α -Amylasen angehören, der in der internationalen Patentanmeldung WO 03/002711 A2 definiert wird, und die, die in der Anmeldung WO 03/054177 A2 beschrieben werden. Ebenso sind Fusionsprodukte der genannten Moleküle einsetzbar. Darüber hinaus sind die unter den Handelsnamen Fungamyl® von der Firma Novozymes erhältlichen Weiterentwicklungen der α -Amylase aus *Aspergillus niger* und *A. oryzae* geeignet. Weitere einsetzbare Handelsprodukte sind beispielsweise die Amylase-LT® und Stainzyme® bzw. Stainzyme ultra® oder Stainzyme plus®, letztere ebenfalls von der Firma Novozymes. Auch durch Punktmutationen erhältliche Varianten dieser Enzyme können erfindungsgemäß eingesetzt werden.

[0017] Beispiele für verwendbare Lipasen oder Cutinasen, die insbesondere wegen ihrer Triglycerid-spaltenden Aktivitäten enthalten sind, aber auch, um aus geeigneten Vorstufen in situ Persäuren zu erzeugen, sind die ursprünglich aus *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*) erhältlichen, beziehungsweise weiterentwickelten Lipasen, insbesondere solche mit dem Aminosäureaustausch D96L. Sie werden beispielsweise von der Firma Novozymes unter den Handelsnamen Lipolase®, Lipolase® Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® und Lipex® vertrieben. Des Weiteren sind beispielsweise die Cutinasen einsetzbar, die ursprünglich aus *Fusarium solani* pisi und *Humicola insolens* isoliert worden sind. Ebenso brauchbare Lipasen sind von der Firma Amano unter den Bezeichnungen Lipase CE®, Lipase P®, Lipase B®, beziehungsweise Lipase CES®, Lipase AKG®, *Bacillus* sp. Lipase®, Lipase AP®, Lipase M-AP® und Lipase AML® erhältlich. Von der Firma Genencor sind beispielsweise die Lipasen beziehungsweise Cutinasen einsetzbar, deren Ausgangsenzyme ursprünglich aus *Pseudomonas mendocina* und *Fusarium solanii* isoliert worden sind. Als weitere wichtige Handelsprodukte sind die ursprünglich von der Firma Gist-Brocades vertriebenen Präparationen M1 Lipase® und Lipomax® und die von der Firma Meito Sangyo KK, Japan, unter den Namen Lipase MY-30®, Lipase OF® und Lipase PL® vertriebenen Enzyme zu erwähnen, ferner das Produkt Lumafast® von der Firma Genencor.

[0018] Cellulasen können je nach Zweck als reine Enzyme, als Enzympräparationen oder in Form von Mischungen, in denen sich die einzelnen Komponenten vorteilhafterweise hinsichtlich ihrer verschiedenen Leistungsaspekte ergänzen, vorhanden sein. Zu diesen Leistungsaspekten zählen insbesondere die Beiträge der Cellulase zur Primärwaschleistung des Mittels (Reinigungsleistung), zur Sekundärwaschleistung des Mittels (Antiredepositionswirkung oder Vergrauungsinhibition), zur Avilage (Gewebewirkung) oder zur Ausübung eines "stone washed"-Effekts. Eine brauchbare pilzliche, Endoglucanase-(EG)-reiche Cellulase-Präparation, beziehungsweise deren Weiterentwicklungen wird von der Firma Novozymes unter dem Handelsnamen Celluzyme® angeboten. Die ebenfalls von der Firma Novozymes erhältlichen Produkte Endolase® und Carezyme® basieren auf der 50 kD-EG, beziehungsweise der 43 kD-EG aus *H. insolens* DSM 1800. Weitere einsetzbare Handelsprodukte dieser Firma sind Cellusoft®, Renozyme® und Celluclean®. Weiterhin einsetzbar sind beispielsweise die 20 kD-EG aus *Melanocarpus*, die von der Firma AB Enzymes, Finnland, unter den Handelsnamen Ecostone® und Biotouch® erhältlich sind. Weitere Handelsprodukte der Firma AB Enzymes sind Econase® und Ecopulp®. Weitere geeignete Cellulasen sind aus *Bacillus* sp. CBS 670.93 und CBS 669.93, wobei die aus *Bacillus* sp. CBS 670.93 von der Firma Genencor unter dem Handelsnamen Puradax® erhältlich ist. Weitere Handelsprodukte der Firma Genencor sind "Genencor detergent cellulase L" und IndiAge®Neutra.

[0019] Ferner können insbesondere zur Entfernung bestimmter Problemanschmutzungen weitere Enzyme eingesetzt sein, die unter dem Begriff Hemicellulasen zusammengefasst werden. Hierzu gehören beispielsweise Mannanasen, Xanthanlyasen, Pektinlyasen (= Pektinasen), Pektinesterasen, Pektatlyasen, Xyloglucanases (= Xylanasen), Pullulanases und β -Glucanases. Diesbezüglich geeignete Enzyme sind beispielsweise unter den Namen Gamanase® und Pektinex AR® von der Firma Novozymes, unter dem Namen Rohapec® B1L von der Firma AB Enzymes und unter dem Namen Pyrolase® von der Firma Diversa Corp., San Diego, CA, USA erhältlich. Die aus *Bacillus subtilis* gewonnene β -Glucanase ist unter dem Namen Cereflo® von der Firma Novozymes erhältlich. Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Hemicellulasen sind Mannanasen, welche beispielsweise unter den Handelsnamen Mannaway(R) von dem Unternehmen Novozymes oder Purabrite® von dem Unternehmen Genencor vertrieben werden.

[0020] Ferner können die Enzyme im Rahmen der Erfindung zusammen mit Begleitstoffen, etwa aus der Fermentation oder mit Stabilisatoren, konfektioniert sein.

[0021] Unter all diesen Enzymen sind solche besonders bevorzugt, die an sich gegenüber einer Oxidation vergleichsweise stabil oder beispielsweise über Punktmutagenese stabilisiert worden sind. Hierunter sind insbesondere die bereits erwähnten Handelsprodukte Everlase und Purafect® OxP als Beispiele für solche Proteasen und Duramyl als Beispiel für eine solche α -Amylase anzuführen.

[0022] Erfindungsgemäß eingesetzte Mittel enthalten Enzyme vorzugsweise in Gesamt Mengen von 1×10^{-8} bis 5 Gewichts-Prozent bezogen auf aktives Protein. Bevorzugt sind die Enzyme von 0,001 bis 5 Gew.-%, weiter bevorzugt von 0,01 bis 5 Gew.-%, noch weiter bevorzugt von 0,05 bis 4 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,075 bis 3,5 Gew.-% in diesen Mitteln enthalten, wobei jedes enthaltene Enzym in den genannten Mengen vorliegen kann.

[0023] Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe bekannter Methoden, zum Beispiel dem BCA-Verfahren (Bicinchonin-

säure; 2,2'-Bichinolyl-4,4'-dicarbonsäure) oder dem Biuret-Verfahren (A. G. Gornall, C. S. Bardawill und M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), S. 751-766) bestimmt werden.

[0024] Die als Komponente (a) eingesetzte Protease und das optional mindestens eine weitere hydrolytische Enzym, das in einem Wasch- oder Reinigungsmittel, vorhanden ist, unterstützt die Reinigungsleistung des Mittels hinsichtlich bestimmter Anschmutzungen oder Flecken. Besonders bevorzugt enthält ein solches Mittel mehrere Enzyme, wobei die Enzyme gleichen oder verschiedenen Enzymklassen angehören können. Besonders bevorzugt zeigen die Enzyme synergistische Effekte hinsichtlich ihrer Wirkung gegenüber bestimmter Anschmutzungen oder Flecken, d.h. die in der Mittelzusammensetzung enthaltenen Enzyme unterstützen sich in ihrer Reinigungsleistung gegenseitig.

[0025] Synergistische Effekte können nicht nur zwischen verschiedenen Enzymen vorliegen, sondern treten insbesondere auch zwischen einem oder mehreren Enzymen und weiteren Inhaltsstoffen des Mittels auf. Erfindungsgemäß wird hierfür eine Protease (a) kombiniert mit einer Komponente (b), d.h. mindestens einer Substanz, die im Zusammenwirken mit der Protease (a) bei Anwendung des Mittels eine synergistische Reinigungsleistung bewirkt und die ausgewählt ist aus einem mikrobiellen Metaboliten (iii).

[0026] Das Mittel kann zusätzlich zu dem mikrobiellen Metaboliten (iii) eine (i) Aminosäure oder Polyaminosäure oder deren Derivat und/oder ein (ii) Biotensid enthalten.

[0027] Bei den unter (i) angegebenen Substanzen handelt es sich bevorzugt um Aminosäuren oder Polymere davon oder deren Salze oder deren Derivate, wobei beide Stereoisomere der Aminosäuren eingesetzt werden können, also sowohl D- als auch L-Aminosäuren, auch in Kombination, bzw. entsprechende Polymere oder Derivate. Eine Polyaminosäure umfasst diesbezüglich mindestens zwei Aminosäurereste. Besonders bevorzugt handelt es sich um Glutamat, Polyglutamat, Lysin, Glutamin, Histidin, Phenylalanin, Tyrosin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Prolin, Valin, Glutamin, Cystein, Tryptophan, Threonin, Serin, Glycin, Aspartat und Asparagin. Bevorzugt werden geladene Polyaminosäuren eingesetzt und hierunter weiter bevorzugt negativ geladene Polyaminosäuren. Besonders bevorzugt eingesetzt werden Poly-Glutaminsäure, darunter γ -D-Polyglutaminsäure, L-Polyglutaminsäure und DL-Polyglutaminsäure, Poly-Asparaginsäure, darunter β -D-Polyasparaginsäure und L-Polyasparaginsäure, Poly-Glutamin, darunter γ -D-Polyglutamin, L-Polyglutamin und DL-Polyglutamin, sowie Poly-Asparagin, darunter β -D-Polyasparagin und L-Polyasparagin. Ein Beispiel für eine besonders bevorzugte Polyasparaginsäure ist die unter dem Handelsnamen Baypure DS 100 fest G verfügbare Verbindung (Unternehmen Lanxess).

[0028] Unter Derivaten werden im Sinne der vorliegenden Anmeldung solche Substanzen verstanden, deren reine Aminosäure oder Aminosäurekette modifiziert worden ist. Solche Derivatisierungen können beispielsweise bereits biologisch im Zusammenhang mit der Biosynthese durch die Wirtszelle erfolgen oder aber auch durch molekularbiologische Methoden erfolgen. Sie können aber auch chemisch durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette einer Aminosäure oder durch kovalente Bindung einer anderen Verbindung an die Aminosäure bzw. die Aminosäurekette. Bei solch einer Verbindung kann es sich beispielsweise um niedrigmolekulare Verbindungen wie Lipide oder Mono-, Oligo- oder Polysaccharide oder Amine bzw. Aminverbindungen handeln. Ferner können die Aminosäuren bzw. Aminosäureketten weitere chemische Modifikationen aufweisen, insbesondere können sie glykosyliert, hydrolysiert, oxidiert, N-methyliert, N-formyliert, N-acetyliert sein oder Methyl, Formyl, Ethyl, Acetyl, t-Butyl, Anisyl, Benzyl, Trifluoacetyl, N-hydroxysuccinimide, t-Butyloxycarbonyl, Benzoyl, 4-Methylbenzyl, Thioanizyl, Thiocresyl, Benzylloxymethyl, 4-Nitrophenyl, Benzyloxycarbonyl, 2-Nitrobenzoyl, 2-Nitrophenylsulphenyl, 4-Toluenesulphonyl, Pentafluorophenyl, Diphenylmethyl, 2-Chlorobenzyloxycarbonyl, 2,4,5-trichlorophenyl, 2-bromobenzyloxycarbonyl, 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, Triphenylmethyl, 2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulphonyl enthalten. Ebenso ist unter Derivatisierung die kovalente oder nichtkovalente Bindung an einen makromolekularen Träger zu verstehen, genauso wie auch ein nichtkovaler Einschluss in geeignete makromolekulare Käfigstrukturen. Auch Kopplungen mit sonstigen makromolekularen Verbindungen, wie etwa Polyethylenglykol, können vorgenommen sein. Aminosäureketten können weitere chemische Modifikationen aufweisen, wobei die Aminosäuregruppen: -COOH, -OH, =NH, -NH₂, -SH bevorzugt folgende Modifikationen tragen: -COOR, -OR, -NHR, -NR₂, -NHR, -NR, -SR; wobei:

R ist -CH=CH-R², -C=C-R², -C(R²)=CH₂, -C(R²)=C(R³), -CH=NR², -C(R²)=N-R³, ein 4-7 C-Ring System mit oder ohne Substitution, 4-7 Stickstoffheterozyklus mit oder ohne Substitution, oder eine 2 bis 8 Kohlenstoff Kette mit 1 bis 5 Doppel- oder Dreifachbindungen mit Substitutionen selektiert aus R¹, R², oder R³;

R¹ ist H, -R, -NO₂, -CN, -halo, -N₃, -C₁₋₈ alkyl, -(CH₂)_nCO₂R², -C₂₋₈-alkenyl-CO₂R², -O(CH₂)_nCO₂R², -C(O)NR²R³, -P(O)(OR²)₂, alkyl substituiertes tetrazol-5-yl, -(CH₂)_nO(CH₂)_n-aryl, -NR²R³, -(CH₂)_nOR², -(CH₂)_nSR², -N(R²)C(O)R³, -S(O₂)NR²R³, -N(R²)S(O₂)R³, -(CHR²)_nNR²R³, -C(O)R³, (CH₂)_nN(R³)C(O)R³, -N(R²)CR²R³ substituiertes oder nicht substituiertes (CH₂)_n-cycloalkyl, substituiertes oder nicht substituiertes (CH₂)_n-phenyl, oder -zyklus;

R² ist H, -halo, -alkyl, -haloalkyl, -(CH₂)_n-phenyl, -(CH₂)₁₋₃-biphenyl, -(CH₂)₁₋₄-Ph-N(SO₂-C₁₋₂-alkyl)₂, -CO(CHR¹)_nOR¹, -(CHR¹)_n-Heterozyklus, -(CHR¹)_nNHCOR¹, -(CHR¹)_nNHSO₂R¹, -(CHR¹)_n-Ph-N(SO₂-C₁₋₂-alkyl)₂, -(CHR¹)_nC(O)(CHR¹)NHR¹, -(CHR¹)_nC(S)(CHR¹)NHR¹, -(CH₂)_nO(CH₂)_nCH₃, -CF₃, -C₂₋₅-acyl, -(CHR¹)_nOH, -(CHR¹)_nCO₂R¹, -(CHR¹)_n-O-alkyl, -(CHR¹)_nO(CH₂)_n-O-alkyl, -(CHR¹)_n-S-alkyl, -(CHR¹)_n-S(O)-alkyl,

-(CHR¹)_n-S(O₂)-alkyl, -(CHR¹)_n-S(O₂)-NHR³, -(CHR³)_n-N₃, -(CHR³)_nNHR⁴, 2 bis 8 Kohlenstoffatom Alken-Kette mit 1 bis 5 Doppelbindungen, 2 bis 8 Kohlenstoff Alkyne-Kette mit 1 bis 5 Dreifachbindungen, substituierter oder nicht substituierter -(CHR³)_n Heterocyclus, oder substituiertes oder nicht substituiertes gesättigtes oder nicht gesättigtes-(CHR³)_n Cycloalkyl;

5 wobei n größer als 1 ist und R¹ und R³ gleich oder unterschiedlich sein kann;

R³ ist H, -OH, -CN, substituiertes Alkyl, -C₂₋₈ alkenyl, substituiertes oder nicht substituiertes Zykloalkyl, -N(R¹)R², oder 5-6 Kohlenstoff gesättigter oder nicht gesättigter Heterozyklus. -NR²R³ kann bestehen aus einem gesättigten oder nicht gesättigten Heterozyklus oder einem Heterobizyklus von 4 to 7 Atomen;

n ist 0-4;

10 R⁴ und R⁵ besteht jeweils aus: H, -(CH₂)_nOH, -C(O)OR⁶, -C(O)SR⁶, -(CH₂)_nC(O)NR⁷R⁸, -OC(O)OR⁷, einer Aminosäure oder einem Peptid;

R⁶ ist H,

R⁷ ist, -C(R⁷)(R⁸)(CH₂)_nOC(O)R⁹, -(CH₂)_nC(R⁷)(R⁸)OC(O)R⁹, -(CH₂)_nC(R⁷)(R⁸)OC(O)OR⁹, oder -C(R⁷)(R⁸)(CH₂)_nOC(O)OR⁹; und

15 R⁷, R⁸ und R⁹ bestehen jeweils aus H, Alkyl, substituiertes Alkyl, Aryl, substituiertes Aryl, Alkenyl, substituiertes Alkenyl, Alkynyl, substituiertes Alkynyl, Heterozyklus, substituiertes Heterozyklus, Alkylaryl, substituiertes Alkylaryl, Zykloalkyl, substituiertes Zykloalkyl, oder CH₂CO₂-alkyl.

[0029] Bei den unter (ii) angegebenen Substanzen handelt es sich um Biotenside. Darunter werden im Rahmen der

20 Erfindung Substanzen verstanden, die von Mikroorganismen gebildet und oftmals auch abgeschieden werden. Wie klassische Tenside sind die Biotenside oberflächenaktive Substanzen, die die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten verringern und dadurch die Vermischung von wässrigen (hydrophilen) und wasserabstoßenden (hydrophoben) Phasen fördern. Erfindungsgemäß bevorzugte Biotenside gehören vor allem zur Stoffgruppe der Lipide bzw. Lipidderivate, insbesondere Lipopeptide. Sie sind demnach bioaktive, peptidische Substanzen, die von Mikroorganismen gebildet

25 werden. In der Regel werden sie nichtribosomal von den jeweiligen Mikroorganismen synthetisiert, beispielsweise von Gram-positiven Bakterien, insbesondere der Gattungen *Bacillus* und *Streptomyces*, Gram-negativen Bakterien, insbesondere der Gattungen *Pseudomonas* und *Myxobakterien*, sowie von filamentösen Pilzen. Die Peptidketten bestehen bevorzugt aus zwei bis vierzig Aminosäuren und können linear, zyklisch oder verzweigt sein. Im Gegensatz zu ribosomal synthetisierten Peptidketten weisen sie als monomere Bausteine nicht nur proteinogene L-Aminosäuren auf, sondern

30 auch D-Aminosäuren sowie alpha-Hydroxy- und/oder Carbonsäuren aller Art. Bei den Aminosäuren handelt es sich um L-α- bzw. D-α-Aminosäuren, jedoch können auch β-, γ- oder δ-Aminosäuren vorhanden sein, sowohl in D- als auch in L-Konfiguration. Die Peptidketten können auch weitere chemische Modifikationen aufweisen, insbesondere können sie glykosyliert, hydrolysiert, N-methyliert oder N-formyliert sein. Häufig auftretende Strukturelemente sind ferner Thiazolin- und/oder Oxazolinringe in verschiedenen Oxidationsstufen. Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Biotenside sind

35 anionische Lipopeptide und weiter bevorzugt Surfactin-ähnliche oder Lichenysin-ähnliche Substanzen bzw. Surfactin oder Lichenysin selbst. Unter Surfactin-ähnlichen bzw. Lichenysin-ähnlichen Substanzen werden solche verstanden, die entweder eine gleichartige chemische Struktur wie Surfactin bzw. Lichenysin aufweisen und/oder die eine mit Surfactin bzw. Lichenysin vergleichbare Wirkung aufweisen. Surfactin lässt sich insbesondere durch folgende Formel beschreiben: Fettsäure-cyclo-[Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu]. Die Struktur von Surfactin ist ferner in Figur 1 angegeben. Lichenysin

40 lässt sich insbesondere durch folgende Formel beschreiben: Fettsäure-cyclo-[Gln-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Ile]. Da Lichenycin oftmals auch als Lichenisin bezeichnet wird, wird an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass erfindungsgemäß mit der Bezeichnung Lichenysin beide Bezeichnungen umfasst sind.

[0030] Weitere Biotenside sowie diese herstellende Mikroorganismen sind in nachfolgender Tabelle 1 angegeben.

	Tabelle 1:
	Mikroorganismus
45 Biotensid-Typ	
Trehalose Lipide	Arthrobacter paraffineus
	Corynebacterium sp.
	Mycobacterium sp.
50 Rhamnolipide	Rhodococcus erythropolis, Norcardia sp
Sophorolipide	Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas sp., Serratia rubidea
	Candida apicola, Candida bombicola
	Candida lipolytica
55	Candida bogoriensis

(fortgesetzt)

Biotensid-Typ	Mikroorganismus
Glycolipide	Alcanivorax borkumensis
5	Arthrobacter sp., Corynebacterium sp.
	R. erythropolis, Serratia marcescens
	Tsukamurella sp.
Cellobiose Lipide	Ustilago maydis
10	Rhodotorula glutinus
Polyol Lipide	Rhodotorula graminus
	Lactobacillus fermentii
Diglycosyl Diglyceride	Acinetobacter calcoacetus (RAG1)
Lipopolysaccharide	Pseudomonas sp., Candida lipolytica
15	Arthrobacter sp.
Lichenysin A, Lichenysin B.	Bacillus licheniformis
Surfactin	Bacillus subtilis, Bacillus pumilus
Viscosin	Pseudomonas fluorescens
20	Thiobacillus thiooxidans
Ornithin, Lysin Peptide	Streptomyces sioyaensis
	Gluconobacter cerinus
Phospholipide	Acinetobacter sp.
Sulfonylipide	T. thioosidans
25	Corynebacterium alkanolyticum
Fettsäuren	Capnocytophaga sp.
("Corynomy colic adics, spiculisporic acids", usw.)	Penicillium spiculigerum
	Corynebacterium lepus
30	Arthrobacter paraffineus
	Talaromyces trachyspermus
	Norcadia erythropolis
Alasan	Acinetobacter radioresistens
Streptofactin	Streptomyces tendae
35	Pseudomonas marginalis
"Particulate surfactant" (PM)	Pseudomonas maltophilia
Biosur PM	

[0031] Bei den unter (iii) angegebenen Substanzen handelt es sich um mikrobielle Metabolite. Darunter werden Substanzen verstanden, die als Zwischenstufen oder als Abbauprodukte von Stoffwechselvorgängen des Mikroorganismus oder als Abbauprodukte von Nährmedium durch den Mikroorganismus entstehen. Erfindungsgemäß bevorzugte mikrobielle Metabolite sind im Kulturmedium einer Kultur des sie bildenden Mikroorganismus vorhanden. Besonders bevorzugt werden sie daher von dem sie bildenden Mikroorganismus sezerniert. Erfindungsgemäß verwendete mikrobielle Metabolite sind 2,3-Butandiol, Pyruvat, Propionat, Butyrat, . Als weitere mikrobielle Metabolite können Acetat, Lactat, 2-Methylpropionat, 3-Methylbutyrat, α -Ketogluterat, Acetoin, Propandiol, Glycol, Glycerin, Citrat, Formiat, Ethanol, Methanol oder Butanol genannt werden.

[0032] Bevorzugt wird die Komponente (b) dem Waschmittel- oder Reinigungsmittel als separater Einzelstoff, d.h. nicht als ein Bestandteil eines weiteren Inhaltsstoffes des Wasch- oder Reinigungsmittels, zugefügt. Bevorzugt liegt die Komponente (b) daher frei in dem Wasch- bzw. Reinigungsmittel vor, d.h. sie ist in diesem verteilt und möglichst homogen verteilt. Im Falle von flüssigen oder gelförmigen Wasch- oder Reinigungsmitteln ist die Komponente (b) bevorzugt in diesen gelöst oder dispergiert. Besonders bevorzugt enthält das Wasch- oder Reinigungsmittel die Komponente (b) nicht als Bestandteil der Darreichungsform des hydrolytischen Enzyms (a), insbesondere nicht als Bestandteil eines Enzymgranulates.

[0033] Erfindungsgemäß bevorzugt sind flüssige oder gelförmige, d.h. nicht feste Wasch- oder Reinigungsmittel.

[0034] Eine synergistische Reinigungsleistung der Komponente (b), die im Zusammenwirken mit dem hydrolytischen Enzym (a) bei Anwendung des Mittels eine synergistische Reinigungsleistung bewirkt, wird in einem Waschsystem bestimmt, das ein Waschmittel in einer Dosierung zwischen 4,5 und 7,0 Gramm pro Liter Waschflotte sowie das hydrolytische Enzym (a) und die Komponente (b) jeweils einzeln oder in Kombination enthält, wobei das Enzym jeweils aktivitätsgleich eingesetzt ist, die Komponente (b) eingesetzt ist in einer Konzentration von 0,00025 bis 0,6 Gew.-%,

insbesondere von 0,0003 bis 0,5 Gew.-% (Einsatzkonzentration in der Waschflotte), und die Waschleistung gegenüber einer oder mehrerer der Anschmutzungen Blut-Milch/Tusche auf Baumwolle, Voll-Ei/Pigment auf Baumwolle, Schokolade-Milch/Tusche auf Baumwolle, Erdnuss Öl-Pigment/Tusche auf Polyester/Baumwolle, Gras auf Baumwolle und Kakao auf Baumwolle, insbesondere gegenüber einer oder mehrerer der Anschmutzungen

- 5
- Blut-Milch/Tusche auf Baumwolle: Produkt Nr. C5 von CFT B.V. Vlaardingen, Holland
 - Voll-Ei/Pigment auf Baumwolle: Produkt Nr. 10N erhältlich von der Firma wfk Testgewebe GmbH; Brüggen-Bracht, Deutschland, in kleine Stücke geschnitten
 - Schokolade-Milch/Tusche auf Baumwolle: Produkt Nr. C3 von CFT B.V. Vlaardingen, Holland
 - 10 - Erdnuss Öl-Pigment/Tusche auf Polyester/Baumwolle: Produkt Nr. PC10 von CFT B.V. Vlaardingen, Holland
 - Gras auf Baumwolle: Produkt Nr. 164 von erhältlich von der Firma Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Schweiz
 - Kakao auf Baumwolle: Produkt Nr. 112 von erhältlich von der Firma Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Schweiz,
- 15

bestimmt wird durch Messung des Weißheitsgrades der gewaschenen Textilien, der Waschvorgang für mindestens 30 Minuten, optional 60 Minuten, bei einer Temperatur von 40°C erfolgt und das Wasser eine Wasserhärte zwischen 15,5 und 16,5° (deutsche Härte) aufweist.

[0035] Ein bevorzugtes flüssiges Waschmittel für ein solches Waschsystem ist wie folgt zusammengesetzt (alle Angaben in Gewichts-Prozent): 0,3- 0,5% Xanthan Gum, 0,2-0,4% Anti-Schaummittel, 6-7% Glycerin, 0,3-0,5% Ethanol, 4-7% FAEOS (Fettalkoholethersulfat), 24-28% nichtionische Tenside, 1% Borsäure, 1-2% Natriumcitrat (Dihydrat), 2-4% Soda, 14-16% Kokosnuss-Fettsäuren, 0,5% HEDP (1-Hydroxyethan-(1,1-di-phosphonsäure)), 0-0,4% PVP (Polyvinylpyrrolidon), 0-0,05% optischer Aufheller, 0-0,001% Farbstoff, Rest demineralisiertes Wasser. Bevorzugt beträgt die Dosierung des flüssigen Waschmittels zwischen 4,5 und 5,5 Gramm pro Liter Waschflotte, beispielsweise 4,9 Gramm pro Liter Waschflotte. Bevorzugt wird gewaschen in einem pH-Wertebereich zwischen pH 8 und pH 10,5, bevorzugt zwischen pH 8 und pH 9.

[0036] Ein bevorzugtes pulverförmiges Waschmittel für ein solches Waschsystem ist wie folgt zusammengesetzt (alle Angaben in Gewichts-Prozent): 10 % lineares Alkylbenzolsulfonat (Natrium-Salz), 1,5 % C12-C18-Fettalkoholsulfat (Natrium-Salz), 2,0 % C12-C18-Fettalkohol mit 7 EO, 20 % Natriumcarbonat, 6,5 % Natriumhydrogencarbonat, 4,0 % amorphes Natriumdisilikat, 17 % Natriumcarbonat-peroxohydrat, 4,0 % TAED, 3,0 % Polyacrylat, 1,0 % Carboxymethylcellulose, 1,0 % Phosphonat, 25 % Natriumsulfat, Rest: optional Schauminhibitoren, optischer Aufheller, Duftstoffe und ggfs. Wasser ad 100%. Bevorzugt beträgt die Dosierung des flüssigen Waschmittels zwischen 6,0 und 7,0 Gramm pro Liter Waschflotte, beispielsweise 6,7 Gramm pro Liter Waschflotte. Bevorzugt wird gewaschen in einem pH-Wertebereich zwischen pH 9 und pH 11.

[0037] Bevorzugt wird ein flüssiges Waschmittel verwendet.

[0038] Der Weißheitsgrad, d.h. die Aufhellung der Anschmutzungen, wird bevorzugt mit optischen Messverfahren bestimmt, bevorzugt photometrisch. Ein hierfür geeignetes Gerät ist beispielsweise das Spektrometer Minolta CM508d. Üblicherweise werden die für die Messung eingesetzten Geräte zuvor mit einem Weißstandard, bevorzugt einem mitgelieferten Weißstandard, kalibriert.

[0039] Durch denaktivitätsgleichen Einsatz wird sichergestellt, dass auch bei einem etwaigen Auseinanderklaffen des Verhältnisses von Aktivsubstanz zu Gesamtprotein (die Werte der spezifischen Aktivität) die jeweiligen enzymatischen Eigenschaften, also beispielsweise die Waschleistung an bestimmten Anschmutzungen, verglichen werden. Generell gilt, dass eine niedrige spezifische Aktivität durch Zugabe einer größeren Proteinmenge ausgeglichen werden kann. Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivitäten sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Enzymtechnologie geläufig und werden von ihm routinemäßig angewendet. Beispielsweise sind Verfahren zur Bestimmung der Proteaseaktivität offenbart in Tenside, Band 7 (1970), S. 125-132. Die Proteaseaktivität wird vorzugsweise in PE (Protease-Einheiten) angegeben. Beispielsweise geeignete Proteaseaktivitäten betragen 5 oder 10 PE (Protease-Einheiten) pro ml Waschflotte. Die eingesetzte enzymatische Aktivität ist jedoch nicht gleich Null.

[0040] Bevorzugt basiert die synergistische Reinigungsleistung auf einem neuen Wirkmechanismus, d.h. es erfolgt keine Steigerung der Enzymaktivität per se im klassischen Sinne, wie sie - bezogen auf Proteasen - in einem der nachfolgenden Verfahren gemessen werden würde. Ein erfindungsgemäßer Synergismus ist demnach auch insbesondere dann vorhanden, wenn eine verbesserte Reinigungsleistung in Anwesenheit von Komponenten (a) und (b) gegenüber der Summe der Reinigungsleistungen der Komponente (a) alleine und der Komponente (b) alleine festgestellt wird, und die Komponente (b) in mindestens einem den nachfolgenden Testverfahren, bevorzugt in beiden nachfolgenden Testverfahren, keinen Effekt hinsichtlich der Steigerung der proteolytischen Aktivität der Komponente (a) über die messbedingte Standardabweichung hinaus zeigt:

Verfahren 1

[0041] Die Protease-Aktivität wird quantitativ über die Freisetzung des Chromophors para-Nitroanilin (pNA) aus dem Substrat bestimmt. Bei dem Substrat handelt es sich um: suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilid (Substratlösung: 110 mM in DMSO). Die Protease spaltet das Substrat und setzt pNA frei. Die Freisetzung des pNA verursacht eine Zunahme der Extinktion bei 410 nm, deren zeitlicher Verlauf ein Maß für die enzymatische Aktivität ist (vgl. Del Mar et al., 1979).

[0042] Die Messung erfolgt bei einer Temperatur von 25°C, bei pH 8,6 und einer Wellenlänge von 410 nm. Die Messzeit beträgt 5 min und das Messintervall 20s bis 60s.

[0043] Der Gebrauchspuffer (Tris-HCl pH 8,6) wird als Blank-Probe verwendet. Zu jeder Kuvette werden 10 µL der Substratlösung gegeben. Je Probe werden 1000 µL Puffer in eine Kuvette gegeben. Es werden 1-300 µL der Puffer bzw. der Komponente (b) (0,1, 0,2, 0,5 oder 1 Gew.-% in Gebrauchspuffer) in die Kuvette gegeben. Es werden 1-300 µL der Protease bzw. der Blank-Probe in die Kuvette gegeben. Der Start der Messung erfolgt durch Mischen der Probe. Nach dem Mischen werden die Kvetten sofort in das Photometer überführt und die Messung gestartet. Eine Aktivierung oder Stabilisierung der Protease kann mittels der Messdaten quantifiziert werden.

Verfahren 2

[0044] Die Protease-Aktivität wird über die Hydrolyse von Casein und anschließende Reaktion von in TCA löslichen Peptiden mit Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz bestimmt. Die Extinktion des resultierenden Komplexes wird bei 660 nm gemessen und mit einem Tyrosin-Standard verglichen. Reaktionsmischungen enthalten 3 ml 0,8 % (w/v) Casein und 0,5 ml einer geeigneten Enzymverdünnung mit oder ohne der zu testenden Komponente (b) (Konzentration 0,1, 0,2, 0,5 oder 1 Gew.-%), beide in Universalpuffer 1 von Britton und Robinson, pH 9,5 (vgl. J. Chem. Soc. 1931, S. 1451). Die Mischungen werden für 30 Minuten bei 25°C inkubiert, dann wird die Reaktion durch Zugabe von Stopreagenz (TCA) abgebrochen. In Kontrollreaktionen wird das Stopreagenz vor Enzymzugabe mit oder ohne der zu testenden Substanz zugegeben. Nach 20 Minuten bei 25°C werden die Reaktionsmischungen durch Whatman-Filterpapier Nr. 42 filtriert oder zentrifugiert.

[0045] Zu dem Filtrat wird Wasser, Natriumcarbonat und Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation wird die Extinktion bei 660 nm bestimmt. In vergleichbarer Weise wird ein aliquotierter Teil von 200 µL eines Tyrosin-Standards bestimmt. Die Aktivität wird in Protease Einheiten ausgedrückt, wobei 1 PE definiert ist als die Menge an proteolytischem Enzym, die zur Freisetzung von 1 mmol Tyrosin führt, freigesetzt pro Minute unter definierten Bedingungen (vgl. Anson, M.L., (1938) J. Gen. Physiol. 22, 79-89 sowie Folin, O., and Ciocalteu, V., (1929) J. Biol. Chem. 73, 627).

[0046] Vorteilhafte synergistische Reinigungsleistungen ergeben sich weiter auch dadurch, dass der als Komponente (b) eingesetzte mikrobielle Metabolit (iii) bzw. die optional zusätzlich eingesetzten Substanzen (i) und (ii) in bestimmten Konzentrationen in dem Wasch- oder Reinigungsmittel vorliegt, zum Beispiel, dass i. die Aminosäure oder Polyamino-
säure in dem Mittel vorliegt von 0,018 bis 0,2 Gew.-%, insbesondere von 0,04 bis 0,1 Gew.-%,

ii. das Biotensid in dem Mittel vorliegt von 0,001% bis 25 Gew.-%, insbesondere von 0,005 bis 10 Gew.-%,
iii. der mikrobielle Metabolit in dem Mittel vorliegt von 0,018 bis 0,2 Gew.-%, insbesondere von 0,04 bis 0,1 Gew.-%.

[0047] Betreffend die Einsatzkonzentration, also die Konzentration in der Wasch- bzw. Reinigungsflotte, ergibt sich eine besonders vorteilhafte synergistische Reinigungsleistung ebenfalls dadurch, dass die als Komponente (b) eingesetzte Substanz in einer bestimmten Konzentration in der Wasch- bzw. Reinigungsflotte vorliegt, zum Beispiel, dass diese Komponente in der Wasch- bzw. Reinigungsflotte vorliegt in einer Konzentration von 0,00025 bis 0,6 Gew.-%, insbesondere von 0,0003 bis 0,5 Gew.-%.

[0048] Zu erfindungsgemäß einsetzbaren Wasch- und Reinigungsmitteln zählen alle denkbaren Wasch- bzw. Reinigungsmittelarten, sowohl Konzentrate als auch unverdünnt anzuwendende Mittel, zum Einsatz im kommerziellen Maßstab, in der Waschmaschine oder bei der Handwäsche beziehungsweise -reinigung. Dazu gehören beispielsweise Waschmittel für Textilien, Teppiche, oder Naturfasern, für die die Bezeichnung Waschmittel verwendet wird. Dazu gehören beispielsweise auch Geschirrspülmittel für Geschirrspülmaschinen oder manuelle Geschirrspülmittel oder Reiniger für harte Oberflächen wie Metall, Glas, Porzellan, Keramik, Kacheln, Stein, lackierte Oberflächen, Kunststoffe, Holz oder Leder, für die die Bezeichnung Reinigungsmittel verwendet wird, also neben manuellen und maschinellen Geschirrspülmitteln beispielsweise auch Scheuermittel, Glasreiniger, WC-Duftspüler, usw. Zu den Wasch- und Reinigungsmitteln im Rahmen der Erfindung zählen ferner Waschhilfsmittel, die bei der manuellen oder maschinellen Textilwäsche zum eigentlichen Waschmittel hinzudosiert werden, um eine weitere Wirkung zu erzielen. Ferner zählen zu Wasch- und Reinigungsmittel im Rahmen der Erfindung auch Textilvor- und Nachbehandlungsmittel, also solche Mittel, mit denen das Wäschestück vor der eigentlichen Wäsche in Kontakt gebracht wird, beispielsweise zum Anlösen hart-

näckiger Verschmutzungen, und auch solche Mittel, die in einem der eigentlichen Textilwäsche nachgeschalteten Schritt dem Waschgut weitere wünschenswerte Eigenschaften wie angenehmen Griff, Knitterfreiheit oder geringe statische Aufladung verleihen. Zu letztgenannten Mittel werden u.a. die Weichspüler gerechnet.

[0049] Die erfindungsgemäß einsetzbaren Wasch- oder Reinigungsmittel, die als insbesondere pulverförmige Feststoffe, in nachverdichteter Teilchenform, als homogene Lösungen oder Suspensionen vorliegen können, können außer den erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoffen - den Komponenten (a) und (b) - im Prinzip alle bekannten und in derartigen Mitteln üblichen Inhaltsstoffe enthalten, wobei bevorzugt mindestens ein weiterer Inhaltsstoff in dem Mittel vorhanden ist. Die Mittel können insbesondere Buildersubstanzen, oberflächenaktive Tenside, Bleichmittel auf Basis organischer und/oder anorganischer Persauerstoffverbindungen, Bleichaktivatoren, wassermischbare organische Lösungsmittel, Enzyme, Sequestrierungsmittel, Elektrolyte, pH-Regulatoren und weitere Hilfsstoffe wie optische Aufheller, Vergrauungsinhibitoren, Schaumregulatoren sowie Farb- und Duftstoffe sowie Kombinationen hiervon enthalten. Insbesondere eine weitere Kombination der erfindungsgemäßen Wirkstoffe mit einem oder mehreren weiteren Inhaltsstoff(en) der Mittel erweist sich als vorteilhaft, da dann eine weiter verbesserte Reinigungsleistung durch weitere sich ergebende Synergismen erreicht werden kann. Insbesondere durch die Kombination mit einem Tensid und/oder einer Buildersubstanz und/oder einem Bleichmittel wird ein solcher weiterer Synergismus erreicht. Solche bevorzugten weiteren Inhaltsstoffe des Wasch- oder Reinigungsmittels sind offenbart in der internationalen Offenlegungsschrift WO 2009/021867, auf deren Offenbarung daher ausdrücklich verwiesen bzw. deren Offenbarung daher ausdrücklich in die vorliegende Anmeldung einbezogen wird.

[0050] Die zu wählenden Inhaltsstoffe wie auch die Bedingungen, unter denen das Mittel eingesetzt wird, wie beispielsweise Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Redox-Verhältnisse oder mechanische Einflüsse, sollten für das jeweilige Reinigungsproblem optimiert sein. So liegen übliche Temperaturen für den Einsatz von Wasch- und Reinigungsmitteln in Bereichen von 10°C über 40°C und 60°C bis hin zu 95° bei maschinellen Mitteln oder bei technischen Anwendungen. Vorzugsweise werden die Inhaltsstoffe der betreffenden Mittel aufeinander abgestimmt, insbesondere derart, dass sich Synergien hinsichtlich der Reinigungsleistung ergeben. Besonders bevorzugt sind Synergien, die in einem Temperaturbereich zwischen 10°C und 60°C vorhanden sind, insbesondere in einem Temperaturbereich von 10°C bis 50°C, von 10°C bis 40°C, von 10°C bis 30°C, von 15°C bis 30°C von 10°C bis 25°C, von 15°C bis 25°C und ganz besonders bevorzugt bei 20°C.

[0051] Ein erfindungsgemäß einsetzbares Mittel enthält ferner das hydrolytische Enzym in einer Menge von 2 mg bis 20 mg, vorzugsweise von 5 mg bis 17,5 mg, besonders bevorzugt von 20 mg bis 15 mg und ganz besonders bevorzugt von 50 mg bis 10 mg pro g des Mittels. Ferner kann das in dem Mittel enthaltene hydrolytische Enzym, insbesondere eine Protease, und/oder weitere Inhaltsstoffe des Mittels mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für das Enzym undurchlässigen Substanz umhüllt sein, welche unter Anwendungsbedingungen des Mittels durchlässig für das Enzym wird. Eine solche Ausführungsform der Erfindung ist somit dadurch gekennzeichnet, dass das hydrolytische Enzym mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für das Enzym undurchlässigen Substanz umhüllt ist. Weiterhin kann auch das Wasch- oder Reinigungsmittel selbst in einem Behältnis, vorzugsweise einem luftdurchlässigen Behältnis, verpackt sein, aus dem es kurz vor Gebrauch oder während des Waschvorgangs freigesetzt wird.

[0052] Das Wasch- oder Reinigungsmittel

- 40 (a) liegt in fester Form vor, insbesondere als rieselfähiges Pulver mit einem Schüttgewicht von 300 g/l bis 1200 g/l, insbesondere 500 g/l bis 900 g/l, oder
- (b) liegt in pastöser oder in flüssiger Form vor, und/oder
- (c) liegt als Einkomponentensystem vor, oder
- (d) ist in mehrere Komponenten aufgeteilt.

[0053] Diese Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen ferner alle festen, pulverförmigen, flüssigen, gelförmigen oder pastösen Darreichungsformen der erfindungsgemäß einsetzbaren Mittel, die gegebenenfalls auch aus mehreren Phasen bestehen können sowie in komprimierter oder nicht komprimierter Form vorliegen können. Das Mittel kann als rieselfähiges Pulver vorliegen, insbesondere mit einem Schüttgewicht von 300 g/l bis 1200 g/l, insbesondere 500 g/l bis 900 g/l oder 600 g/l bis 850 g/l. Zu den festen Darreichungsformen des Mittels zählen ferner Extrudate, Granulate, Tabletten oder Pouches. Alternativ kann das Mittel auch flüssig, gelförmig oder pastös sein, beispielsweise in Form eines nicht-wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer nicht-wässrigen Paste oder in Form eines wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer wasserhaltigen Paste. Weiterhin kann das Mittel als Einkomponentensystem vorliegen. Solche Mittel bestehen bevorzugt aus einer Phase. Alternativ kann ein Mittel auch aus mehreren Phasen bestehen. Ein solches Mittel ist demnach in mehrere Komponenten aufgeteilt.

[0054] Erfindungsgemäß einsetzbare Wasch- oder Reinigungsmittel können ausschließlich eine Protease enthalten. Alternativ können sie aber auch weitere hydrolytische Enzyme oder andere Enzyme in einer für die Wirksamkeit des Mittels zweckmäßigen Konzentration enthalten, wobei prinzipiell alle im Stand der Technik für diese Zwecke etablierten

Enzyme einsetzbar sind. Als weitere Enzyme bevorzugt einsetzbar sind alle Enzyme, die in dem Mittel eine katalytische Aktivität entfalten können, insbesondere Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Mannanasen, Tannasen, Xylanasen, Xanthanasen, β -Glucosidasen, Carrageeninasen, Oxidasen, Perhydrolasen, Oxidoreduktasen oder Lipasen, sowie vorzugsweise deren Gemische. Diese Enzyme sind im Prinzip natürlichen Ursprungs; ausgehend von den natürlichen Molekülen stehen für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln verbesserte Varianten zur Verfügung, die entsprechend bevorzugt eingesetzt werden.

5 [0055] Weiter wird ein Wasch- oder Reinigungsverfahren umfassend die Verfahrensschritte

10 (a) Bereitstellen einer Wasch- oder Reinigungslösung umfassend ein Wasch- oder Reinigungsmittel, das enthält

- i. eine Protease und
- ii. eine Komponente, die im Zusammenwirken mit der Protease bei Anwendung des Mittels eine synergistische Reinigungsleistung bewirkt und die ein mikrobieller Metabolit ist;

15 (b) In Kontakt bringen eines Textils oder einer harten Oberfläche mit der Wasch- oder Reinigungslösung gemäß (a),

wobei der mikrobielle Metabolit aus der aus 2,3-Butandiol, Pyruvat, Propionat, Butyrat und Levan bestehenden Gruppe ausgewählt ist, beschrieben.

20 [0056] Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die vorstehend im Rahmen der Erfindung beschrieben sind, sind auch auf dieses Verfahren anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für dieses Verfahren gilt.

25 [0057] Ein solches Verfahren ist vorteilhaft, da wie vorstehend beschrieben die Reinigungsleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels, das eine Protease enthält, verbessert wird durch den Zusatz einer Komponente wie angegeben. Damit ist das Verfahren vorteilhaft, um von Textilien oder von harten Oberflächen entsprechende Verunreinigungen, insbesondere proteinhaltige Verunreinigungen, zu beseitigen. Ausführungsformen stellen beispielsweise die Handwäsche, die manuelle Entfernung von Flecken von Textilien oder von harten Oberflächen oder maschinelle Verfahren dar.

30 [0058] Verfahren zur Reinigung von Textilien zeichnen sich im allgemeinen dadurch aus, dass in mehreren Verfahrensschritten verschiedene reinigungsaktive Substanzen auf das Reinigungsgut aufgebracht und nach der Einwirkzeit abgewaschen werden, oder dass das Reinigungsgut in sonstiger Weise mit einem Waschmittel oder einer Lösung dieses Mittels behandelt wird. Entsprechendes gilt für Verfahren zur Reinigung von harten Oberflächen.

35 [0059] Da eine Protease, d.h. Komponente (a), natürlicherweise bereits eine proteolytische Aktivität besitzt und diese auch in Medien entfaltet, die sonst keine Reinigungskraft besitzen, wie beispielsweise in bloßem Puffer, kann ein solches Verfahren auch lediglich darin bestehen, dass neben der zugesetzten Komponente (b) als einzige weitere Komponente eine Protease, d.h. Komponente (a), aufgebracht wird, bevorzugt in einer Pufferlösung oder in Wasser.

40 [0060] Alle hier beschriebenen Verfahren werden vorzugsweise in einem Temperaturbereich von 10°C bis 60°C, insbesondere von 10°C bis 50°C, von 10°C bis 40°C, von 10°C bis 30°C, von 15°C bis 30°C von 10°C bis 25°C und von 15°C bis 25°C, durchgeführt. Ein synergistisches Zusammenwirken der Komponenten (a) und (b) hinsichtlich der Reinigungsleistung liegt besonders bei diesen niedrigeren bis mittleren Waschtemperaturen bzw. Reinigungstemperaturen vor.

45 [0061] Wie vorstehend beschrieben wirken die Komponenten (a) und (b) vorteilhaft, insbesondere synergistisch, zusammen, so dass nicht nur die Reinigungsleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels (bzw. der von diesem Mittel gebildeten Waschflotte) verbessert wird, sondern auch die Reinigungsleistung der Protease selbst.

50 [0062] Die Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die vorstehend im Rahmen der Erfindung beschrieben sind, sind auch auf diesen Erfindungsgegenstand anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die vorstehende erfindungsgemäße Verwendung gilt.

55 [0063] Ferner ergeben sich vorteilhafte Reinigungsleistungen insbesondere dadurch, dass der als Komponente (b) eingesetzte mikrobielle Metabolit (iii) bzw. die optional zusätzlich eingesetzten Substanzen (i) und (ii) bestimmte Molekulargewichte aufweisen. Weitere bevorzugte Ausführungsformen erfindungsgemäßer Verwendungen sind demnach dadurch gekennzeichnet, dass

- i. die Aminosäure oder Aminosäure ein Molekulargewicht (MW) aufweist von 150 bis 5x10⁶ Dalton, insbesondere von 200 bis 1x10⁶ Dalton, von 220 bis 0,75x10⁶ Dalton und insbesondere von 400 bis 0,5x10⁶ Dalton,
- ii. das Biotensid ein Molekulargewicht (MW) aufweist von 500 bis 3000 Dalton, insbesondere von 600 bis 2500 Dalton, von 700 bis 2250 Dalton und insbesondere von 800 bis 2000 Dalton,
- iii. der mikrobielle Metabolit ein Molekulargewicht (MW) aufweist von 150 bis 5x10⁶ Dalton, insbesondere von 200 bis 1x10⁶ Dalton, von 220 bis 0,75x10⁶ Dalton und insbesondere von 400 bis 0,5x10⁶ Dalton.

Beispiele:

Beispiel 1

- 5 [0064] Für die Ermittlung der Waschleistung wurde nachfolgend angegebene Rahmenrezeptur für ein Textilwaschmittel verwendet (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2:

	Inhaltsstoff	Gew.-% Reinsubstanz
10	Xanthan	0,3-0,5
	Anti-Schaummittel	0,2-0,4
15	Glycerin	6-7
	Ethanol	0,3-0,5
20	FAEOS	4-7
	Nichtionische Tenside (FAEO, APG, u.a.)	24 - 28
	Borsäure	1
25	Natriumcitrat (Dihydrat)	1-2
	Soda	2-4
	Kokosnuss-Fettsäuren	14-16
	HEDP	0,5
	PVP	0-0,4
30	Optische Aufheller	0-0,05
	Farbstoff	0-0,001
	Parfüm	0-2
	H ₂ O, demineralisiert	Rest

- 30 [0065] Die Testansätze wurden in 48-Napf-Platten in jeweils 1 ml Waschlauge wie nachfolgend in Tabelle 3 angegeben zusammengestellt. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 40°C unter Schütteln (ca. 600 Umdrehungen pro Minute (rpm)).

Tabelle 3:

	Volumina	Lösung
35	420 µl	161-966 mg Textilwaschmittel in 42 ml Wasser oder Puffer
	30-530 µl	1-100 PE/ml Protease
40	30-530 µl	Vorbereite Substanz-Lösung
	Rest	H ₂ O
		Anschmutzung Ø ca. 1cm

- 45 [0066] Es wurden runde Stücke von Anschmutzungen (Durchmesser ca. 10 mm) verwendet, die aus folgenden Anschmutzungen ausgewählt wurden:

Blut-Milch/Tusche auf Baumwolle: Produkt Nr. C5 von CFT B.V. Vlaardingen, Holland Voll-Ei/Pigment auf Baumwolle: Produkt Nr. 10N erhältlich von der Firma wfk Testgewebe GmbH; Brüggen-Bracht, Deutschland, Schokolade-Milch/Tusche auf Baumwolle: Produkt Nr. C3 von CFT B.V. Vlaardingen, Holland Erdnuss Öl-Pigment/Tusche auf Polyester/Baumwolle: Produkt Nr. PC10 von CFT B.V. Vlaardingen, Holland Gras auf Baumwolle: Produkt Nr. 164 von erhältlich von der Firma Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Schweiz Kakao auf Baumwolle: Produkt Nr. 112 von erhältlich von der Firma Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Schweiz.

- [0067] Nach der Inkubation wurden die Anschmutzungen dreimal gespült, getrocknet und fixiert und der Weißgrad der gewaschenen Textilien im Vergleich zu einem Weißstandard (d/8, 8mm, SCI/SCE) gemessen, der auf 100% normiert

worden war (Bestimmung des L-Werts). Die Messung erfolgte an einem Farbmessgerät (Minolta Cm508d) mit einer Lichtarteinstellung von 10°/D65. Die erhaltenen Ergebnisse sind als Prozent Leistung angegeben, wobei die Differenz der Remissionswerte vom Basiswaschmittel ohne Substanz oder Enzyme zu dem mit Protease auf 100% normiert wurde.

[0068] Als Proteasen verwendet wurden die alkalische Protease aus *Bacillus licheniformis* DSM 5483 (WO 92/21760), die Protease aus *Bacillus pumilus* gemäß WO2007/131656 sowie die Protease, die in Figur 2 bzw. SEQ ID NO. 3 der internationalen Offenlegungsschrift WO 03/057713 offenbart ist.

Beispiel 2

[0069] Die Waschleistung wurde mit folgenden reinen Substanzen (Komponente (b)) getestet: 2,3-Butandiol, Pyruvat, Propionat, Butyrat und Levan.

[0070] Stammlösungen mit diesen Substanzen wurden angesetzt mit 0,00001-1,5 M Substanz oder 0,0001-55% (Gewicht) in Wasser oder Puffer (Phosphat 0,00001-1,5 M pH 6,5-8,0 oder Tris 0,00001-1,5 M pH 7,5-9,0 oder Soerensen Puffer pH 7,5-9,0 oder Citrat Puffer 0,00001-1,5 M pH 4,5-7,0 oder Acetat Puffer 0,00001-1,5 M pH 2,5-5,5).

[0071] Die nachfolgenden Tabellen 4 und 5 zeigen die erhaltenen Waschleistungen für die jeweils angegebenen Versuchsansätze (die Abkürzung "n.b." steht für "nicht bestimmt"). Es wird deutlich, dass die eingesetzten Komponenten (b) eine synergistische Steigerung der Waschleistung bei denjenigen Waschmitteln bewirken, die eine Protease, d.h. Komponente (a), enthalten. In Kontrollen, in denen keine Protease enthalten ist (bezeichnet als "Blank") bewirken diese Komponenten (b) keine Steigerung der Waschleistung, so dass die gesteigerte Waschleistung auf einem vorteilhaften, synergistischen Zusammenwirken der Komponenten (a) und (b) beruht.

Tabelle 4:

	Protease	Na-Propionat (0,18 mM) Blank	Na-Propionat (0,18 mM)	Na-Butyrat (1 mM) Blank	Na-Butyrat (1 mM)	Na-Pyruvat (1 mM) Blank	Na-Pyruvat (1 mM)	2,3-Butandiol (0,5 mM) Blank	2,3-Butandiol (0,5 mM)
EMPA164	100%	-47%	127%	-28%	204%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
PC-10	100%	5%	124%	7%	112%	4%	123%	5%	106%
C-03	100%	-51%	119%	-37%	118%	-34%	127%	-43%	120%

Tabelle 5:

	Protease	Levan (0,018%)	Levan (0,018%)
EMPA164	100%	-5%	135%
PC-10	100%	-22%	112%
EMPA 112	100%	-4%	154%

[0072] Beschreibung der Figur:

Figur 1: Struktur von Surfactin

Patentansprüche

1. Verwendung eines mikrobiellen Metabolits zur Steigerung der Reinigungsleistung einer Protease in einem Wasch-

oder Reinigungsprozess, **dadurch gekennzeichnet, dass** der mikrobielle Metabolit aus der aus 2,3-Butandiol, Pyruvat, Propionat, Butyrat, und Levan bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

- 5 2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der mikrobielle Metabolit ein Molekulargewicht (MW) aufweist von 150 bis 5×10^6 Dalton, insbesondere von 200 bis 1×10^6 Dalton, von 220 bis $0,75 \times 10^6$ Dalton und insbesondere von 400 bis $0,5 \times 10^6$ Dalton.

Claims

- 10 1. The use of a microbial metabolite for enhancing the cleaning performance of a protease in a washing or cleaning process, **characterized in that** the microbial metabolite is selected from the group consisting of 2,3-butanediol, pyruvate, propionate, butyrate, and levane.
- 15 2. The use according to claim 1, **characterized in that** the microbial metabolite has a molecular weight (MW) of from 150 to 5×10^6 daltons, in particular from 200 to 1×10^6 daltons, from 220 to $0,75 \times 10^6$ daltons, and in particular from 400 to $0,5 \times 10^6$ daltons.

Revendications

- 20 1. Utilisation d'un métabolite microbien permettant d'améliorer le pouvoir nettoyant d'une protéase dans un processus de lavage ou de nettoyage, **caractérisée en ce que** le métabolite microbien est choisi dans le groupe constitué par le 2,3-butanediol, le pyruvate, le propionate, le butyrate et la levane.
- 25 2. Utilisation selon la revendication 1, **caractérisée en ce que** le métabolite microbien présente une masse moléculaire (MW) de 150 à 5×10^6 daltons, en particulier de 200 à 1×10^6 daltons, de 220 à $0,75 \times 10^6$ daltons et en particulier de 400 à $0,5 \times 10^6$ daltons.

30

35

40

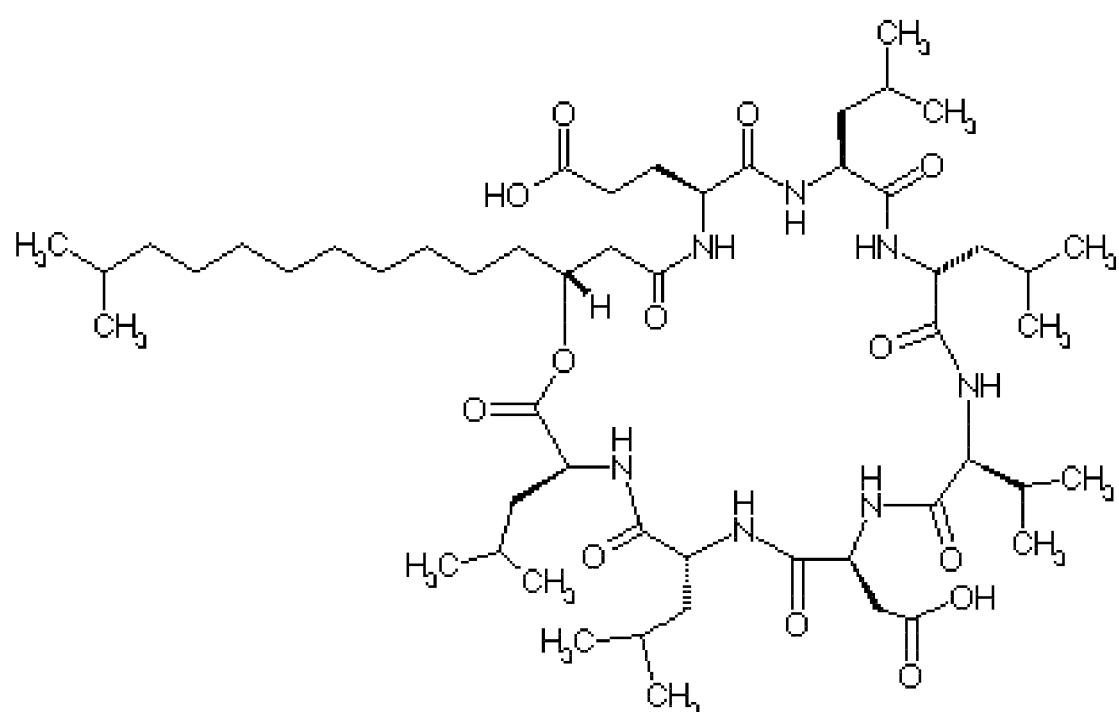
45

50

55

Figur 1:

Surfactin Struktur :



IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- DE 19953057 A1 [0007]
- US 4305837 A [0007]
- WO 2008086916 A [0015]
- WO 2007131656 A [0015] [0068]
- WO 03002711 A2 [0016]
- WO 03054177 A2 [0016]
- WO 2009021867 A [0049]
- WO 9221760 A [0068]
- WO 03057713 A [0068]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- Subtilases: Subtilisin-like Proteases. **VON R. SIEZEN**. Subtilisin enzymes. 1996, 75-95 [0003]
- **A. G. GORNALL ; C. S. BARDAWILL ; M.M. DAVID**. *J. Biol. Chem.*, 1948, vol. 177, 751-766 [0023]
- *Tenside*, 1970, vol. 7, 125-132 [0039]
- *J. Chem. Soc.*, 1931, 1451 [0044]
- **ANSON, M.L.** *J. Gen. Physiol.*, 1938, vol. 22, 79-89 [0045]
- **FOLIN, O. ; CIOCALTEU, V.** *J. Biol. Chem.*, 1929, vol. 73, 627 [0045]