

(19)



(11)

EP 2 358 858 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
07.05.2014 Patentblatt 2014/19

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

(21) Anmeldenummer: **09756715.0**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/EP2009/065200

(22) Anmeldetag: **16.11.2009**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2010/060821 (03.06.2010 Gazette 2010/22)

(54) **WASCH- UND REINIGUNGSMITTEL ENTHALTEND PROTEASEN AUS BACILLUS PUMILUS**
DETERGENTS AND CLEANING AGENTS CONTAINING PROTEASES FROM BACILLUS PUMILUS
PRODUITS NETTOYANTS ET DÉTERGENTS CONTENANT DES PROTÉASES DE BACILLUS PUMILUS

(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

(30) Priorität: **27.11.2008 DE 102008059447**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
24.08.2011 Patentblatt 2011/34

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

(72) Erfinder:
• **SIEGERT, Petra 42781 Haan (DE)**
• **SPITZ, Astrid 47441 Moers (DE)**
• **MAURER, Karl-Heinz 40699 Erkrath (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A1- 0 572 992 WO-A1-95/23221
WO-A1-2007/131656 WO-A1-2009/053157

EP 2 358 858 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Patentanmeldung ist gerichtet auf Wasch- und Reinigungsmittel, die eine Protease aus *Bacillus pumilus* enthalten. Weiterhin ist die Anmeldung gerichtet auf Reinigungsverfahren, in denen diese Mittel eingesetzt werden sowie auf Verwendungen dieser Mittel. Ferner ist die Anmeldung gerichtet auf Reinigungsverfahren unter Anwendung dieser Proteasen sowie auf die Verwendung dieser Proteasen zu Wasch- und Reinigungszwecken.

[0002] Für Wasch- und Reinigungsmittel werden bislang bevorzugt Proteasen vom Subtilisin-Typ eingesetzt. Die in den aus dem Stand der Technik bekannten Wasch- oder Reinigungsmitteln eingesetzten Proteasen stammen entweder ursprünglich aus Mikroorganismen, beispielsweise der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, oder *Pseudomonas*, und/oder werden nach an sich bekannten biotechnologischen Verfahren durch geeignete Mikroorganismen produziert, beispielsweise durch transgene Expressionswirte der Gattungen *Bacillus* oder durch filamentöse Pilze.

[0003] Beispiele hierfür sind die Subtilisine BPN' und Carlsberg, die Protease PB92, die Subtilisine 147 und 309, die Protease aus *Bacillus lentus*, insbesondere aus *Bacillus lentus* 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®, 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 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.

[0004] Aus dem Stand der Technik ist sind ferner Proteasen aus *Bacillus pumilus* bekannt. In der internationalen Anmeldung W02007/131656 ist beispielsweise eine Protease aus *Bacillus pumilus* offenbart und auch als Inhaltsstoff für Wasch- und Reinigungsmittel vorgeschlagen.

[0005] Jedoch ist es längst nicht so, dass jede Protease in einem Waschmittel auch eine zufrieden stellende Reinigungsleistung erbringt. Vielmehr ist der Fall, dass selbst Proteasen, die aus phylogenetisch eng verwandten Organismen wie beispielsweise unterschiedlichen *Bacillus pumilus*-Stämmen stammen, in Wasch- oder Reinigungsmitteln sehr unterschiedliche Reinigungsleistungen aufweisen. Viele Proteasen sind daher nicht für den Einsatz in Wasch- oder Reinigungsmitteln geeignet.

[0006] Ein Nachteil von proteasehaltigen Wasch- und Reinigungsmitteln mit Proteasen aus dem Stand der Technik ist, dass die enthaltenen Proteasen keine zufrieden stellende proteolytische Aktivität aufweisen, insbesondere bei niedrigen Temperaturen, beispielsweise zwischen 10°C und 50°C, insbesondere zwischen 10°C und 40°C oder zwischen 20°C und 40°C, und das Wasch- oder Reinigungsmittel daher keine optimale Reinigungsleistung zeigt, insbesondere nicht in dem jeweiligen Temperaturbereich, und insbesondere nicht an protease-sensitiven Anschmutzungen. Somit besteht der Bedarf, neue Proteasen, insbesondere neue mikrobielle Proteasen, für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln aufzufinden und entsprechende neue Wasch- und Reinigungsmittel bereitzustellen, die solche Proteasen enthalten.

[0007] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Wasch- oder Reinigungsmittel bereitzustellen, die eine verbesserte Reinigungsleistung aufweisen, insbesondere hinsichtlich Anschmutzungen, die sensitiv sind für den Abbau durch Proteasen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Wasch- oder Reinigungsmittel bereitzustellen, die eine verbesserte Reinigungsleistung bei niedrigeren Temperaturen, insbesondere zwischen 10°C und 50°C und bevorzugt zwischen 10°C und 40°C, aufweisen, insbesondere hinsichtlich Anschmutzungen, die sensitiv sind für den Abbau durch Proteasen. Diese Wasch- oder Reinigungsmittel sollten, insbesondere in einem Temperaturbereich zwischen 10°C und 50°C und bevorzugt zwischen 10°C und 40°C, eine verbesserte Entfernung von zumindest einer Anschmutzung zeigen, die sensitiv ist für den Abbau durch eine Protease. Vorzugsweise zeigen die erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel eine verbesserte Entfernung von mehreren Anschmutzungen. Insbesondere sollten diese Wasch- oder Reinigungsmittel Proteasen und besonders bevorzugt natürlicherweise vorkommende Proteasen enthalten, die sich dadurch auszeichnen, dass ihr Beitrag zur Reinigungsleistung eines Mittels, welches die Protease enthält, dem Beitrag von einem für diesen Zweck etablierten proteolytischen Enzym zur Reinigungsleistung des Mittels zumindest nahe kommt und idealerweise übertrifft.

[0008] Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Wasch- oder Reinigungsmittel umfassend eine Protease, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 97,5% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 98%, 98,1%, 98,2%, 98,3%, 98,4%, 98,5%, 98,6%, 98,7%, 98,8%, 98,9%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, sowie mindestens einen weiteren Waschmittelinhaltsstoff. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass eine solche Protease vorteilhaft in einem Wasch- oder Reinigungsmittel einsetzbar ist und diesem eine vorteilhafte Reinigungsleistung verleiht, vor allem auch bei niedrigen Temperaturen, beispielsweise zwischen 10°C und 50°C, insbesondere zwischen 10°C und 40°C oder zwischen 20°C und 40°C. Ein solches Mittel ermöglicht daher eine verbesserte

Entfernung von mindestens einer, bevorzugt von mehreren protease-sensitiven Anschmutzungen auf Textilien und/oder harten Oberflächen, beispielsweise Geschirr.

[0009] Die in einem erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel enthaltene Protease ist, wie anhand der Beispiele nachvollzogen werden kann, aus dem Kulturüberstand eines *Bacillus* Stammes erhältlich, der von der DSMZ (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Deutschland) als ein *Bacillus pumilus* Stamm identifiziert ist. Der Stamm bzw. die ihn enthaltende Bodenprobe stammt aus Minneapolis, USA. Zum Zwecke der Nacharbeitbarkeit wurde gemäß Budapest Vertrag ein Plasmid, das die Nukleinsäuresequenz dieser Protease enthält, bei der DSMZ mit der Hinterlegungsnummer DSM 21890 hinterlegt.

[0010] Eine in einem erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel enthaltene Protease weist eine proteolytische Aktivität auf, das heißt, sie ist zur Hydrolyse von Peptidbindungen eines Polypeptids bzw. Proteins befähigt. Sie ist daher ein Enzym, welches die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysiert und dadurch in der Lage ist, Peptide oder Proteine zu spalten, insbesondere ein Subtilisin. Im Sinne der vorliegenden Erfindung werden Enzyme, Proteine, Fragmente und Derivate, sofern sie nicht explizit als solche angesprochen zu werden brauchen, unter dem Oberbegriff Proteine bzw. Polypeptide zusammengefasst, da ein Protein ein Polypeptid ist.

[0011] Die in einem erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel enthaltene Protease ist auf Grund ihrer proteolytischen Aktivität und ihrer weiteren Eigenschaften, insbesondere betreffend ihre Stabilität gegenüber Tensiden und/oder Bleichmitteln und/oder ihr Temperaturprofil und/oder ihr pH-Profil, für die Anwendung in Wasch- und Reinigungsmitteln geeignet. Überraschenderweise leistet sie bereits in ihrer Wildtyp-Form einen so guten Beitrag zur Reinigungsleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels, welches die Protease enthält, der dem Beitrag von einem für diesen Zweck etablierten proteolytischen Enzym zur Reinigungsleistung des Mittels nahe kommt und ihn an unterschiedlichen Anschmutzungen sogar übertrifft. Dies ist umso überraschender, weil in Bakterien von phylogentisch verwandten Bakterienstämmen, insbesondere verschiedenen *Bacillus pumilus*-Stämmen, unterschiedliche Proteasen in Bezug auf ihre Einsetzbarkeit in Wasch- oder Reinigungsmitteln vorhanden sind, d.h. längst nicht alle Proteasen aus *Bacillus pumilus* sind hierfür tauglich. Die in erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzten Proteasen eignen sich hierfür, und insbesondere bei Anwendung eines sie enthaltenden Wasch- und Reinigungsmittels bewirken sie eine zufriedenstellende Entfernung einer oder mehrerer proteinhaltiger Anschmutzungen, insbesondere in den vorstehend genannten Temperaturbereichen. Sie besitzen daher unter den anspruchsvollen Anwendungsbedingungen von Wasch- und Reinigungsmitteln eine ausreichend hohe proteolytische Aktivität, um proteinhaltige Anschmutzungen unter den Einsatzbedingungen des Wasch- oder Reinigungsmittels abzubauen. Anspruchsvolle Anwendungsbedingungen bei Wasch- und Reinigungsmitteln ergeben sich insbesondere auf Grund der Anwesenheit von einem oder mehreren weiteren Inhaltsstoffen in solchen Mitteln und in der durch sie gebildeten Waschflotte während des Waschvorgangs wie Bleichmittel, Bleichaktivatoren, Tenside, Gerüst (Builder)-Substanzen und/oder auf Grund des pH-Wertes solcher Mittel und der durch sie gebildeten Waschflotte während des Waschvorgangs und/oder auf Grund der Ionenstärke und/oder der Temperatur der Waschflotte während des Waschvorgangs. Unter Reinigungsleistung wird erfindungsgemäß die Aufhellungsleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels an Anschmutzungen, insbesondere an protease-sensitiven Anschmutzungen und hierunter insbesondere an protease-sensitiven Wäscheanschmutzungen, verstanden. Die Reinigungsleistung wird bevorzugt ermittelt wie weiter unten angegeben.

[0012] Zahlreiche Proteasen und insbesondere Subtilisine werden als sogenannte Präproteine, also zusammen mit einem Propeptid und einem Signalpeptid gebildet, wobei die Funktion des Signalpeptids üblicherweise darin besteht, die Ausschleusung der Protease aus der sie produzierenden Zelle in das Periplasma oder das die Zelle umgebende Medium zu gewährleisten, und das Propeptid üblicherweise für die korrekte Faltung der Protease nötig ist. Das Signalpeptid und das Propeptid sind in der Regel der N-terminale Teil des Präproteins. Das Signalpeptid wird unter natürlichen Bedingungen durch eine Signalpeptidase von der übrigen Protease abgespalten. Anschließend erfolgt die durch das Propeptid unterstützte korrekte endgültige Faltung der Protease. Die Protease ist dann in ihrer aktiven Form und spaltet das Propeptid selbst ab. Nach der Abspaltung des Propeptids übt die dann reife (mature) Protease, insbesondere Subtilisin, ihre katalytische Aktivität ohne die ursprünglich vorhandenen N-terminalen Aminosäuren aus.

[0013] Für technische Anwendungen sind aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität die reifen (maturen) Proteasen, d.h. die nach ihrer Herstellung prozessierten Enzyme, gegenüber den Präproteinen bevorzugt. Die Proteasen können von den sie produzierenden Zellen nach der Herstellung der Polypeptidkette modifiziert werden, beispielsweise durch Anknüpfung von Zuckermolekülen, Formylierungen, Aminierungen, usw. Solche Modifikationen werden als posttranslationale Modifikationen bezeichnet. Diese posttranslationalen Modifizierungen können, müssen jedoch nicht einen Einfluss auf die Funktion der Protease ausüben.

[0014] Die Nukleinsäuresequenz einer in einem erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel enthaltenen Protease ist unter SEQ ID NO.1 angegeben. Diese Nukleinsäure codiert für eine Protease, welche eine für Subtilisine typische Einteilung in Signalpeptid, Propeptid und reife (mature) Protease aufweist. Das Gesamtlängenprotein ist unter SEQ ID NO.2 und die reife (mature) Protease unter SEQ ID NO.3 angegeben. Hiermit ist das tatsächlich aktive reife Protein gemeint, weil dieses die technisch relevante Funktion ausübt. Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Wasch- oder Reinigungsmittel enthalten daher die reifen, aktiven Proteasen. Diese weisen ein Molekulargewicht zwischen 25

und 30 kD (Kilodalton) auf, insbesondere 27 kD, ermittelt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

[0015] Für die Protease gemäß SEQ ID NO.3 bzw. SEQ ID NO.2 wurde eine Sequenzanalyse sowie ein Sequenzvergleich mit bekannten Proteinsequenzen aus den allgemein zugänglichen Datenbanken UniProtKB und/oder Swiss-Prot (vgl. UniProtKB, EMBL Outstation - European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, United Kingdom; <http://www.uniprot.org>) und/oder GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), durchgeführt, um die Proteine mit der größten Ähnlichkeit zu ermitteln. Dieser Sequenzvergleich erfolgte mit Hilfe des 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, 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). Ein weiterer im Stand der Technik verfügbarer Algorithmus ist der FASTA-Algorithmus.

[0016] Der Vergleich mit den genannten Datenbanken lieferte einen Datenbankeintrag, der zu der in SEQ ID NO.2 angegebenen Aminosäuresequenz zu 100% identisch ist. Es ist der Datenbankeintrag B2FUW7 (UniProtKB/TrEMBL (B2FUW7_BACPU)) bzw. der Datenbankeintrag AM748727 (Genbank) bzw. dessen Translation CAO03040.1 ("Bacillus pumilus sapB gene for serine alkaline protease preproprotein"). Dieser Eintrag weicht in einer Aminosäureposition von der unter SEQ ID NO.3 angegebenen Aminosäuresequenz der reifen (mature) Protease ab.

[0017] Ferner offenbart der Eintrag contig00263 der Genomsequenzierung des Bacillus pumilus F036B (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA,

vgl. http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial/microbial-detail.xsp?project_id=141) ebenfalls eine Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO.2 angegebenen Aminosäuresequenz zu 100% identisch ist.

[0018] Aus diesen Datenbankeinträgen gehen jedoch weder Wasch- oder Reinigungsmittel hervor, die eine solche Protease oder eine zu dieser Protease ähnliche Protease enthalten, noch enthalten die Einträge Informationen über die vorteilhafte Anwendbarkeit entsprechender Proteasen in Wasch- oder Reinigungsmitteln.

[0019] Die Bestimmung der Identität von Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen erfolgt durch einen Sequenzvergleich. Durch einen solchen Vergleich mit bekannten Enzymen, die beispielsweise in allgemein zugänglichen Datenbanken hinterlegt sind, lässt sich aus der Aminosäure- oder Nukleotid-Sequenz auch die enzymatische Aktivität eines betrachteten Enzyms folgern. Diese kann durch andere Bereiche des Proteins, die nicht an der eigentlichen Reaktion beteiligt sind, qualitativ oder quantitativ modifiziert werden. Dies könnte beispielsweise die Enzymstabilität, die Aktivität, die Reaktionsbedingungen oder die Substratspezifität betreffen.

[0020] Solch ein Vergleich geschieht dadurch, dass ähnliche Abfolgen in den Nukleotidsequenzen (oder auch Aminosäuresequenzen) einander zugeordnet werden. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Bei der Analyse von Nukleotidsequenzen sind wiederum beide komplementären Stränge und jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen; ebenso die Degeneriertheit des genetischen Codes und die organismenspezifische Verwendung der Codons (Codon-Usage). Üblicherweise werden Sequenzvergleiche und Alignments über Computerprogramme erstellt. Häufig genutzt werden beispielsweise Clustal (vgl. beispielsweise Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500) oder T-Coffee (vgl. beispielsweise Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) sowie BLAST oder FASTA für die Datenbanksuche, beziehungsweise Programme, die auf diesen Programmen bzw. Algorithmen basieren. In der vorliegenden Patentanmeldung wurden Sequenzvergleiche und Alignments mit dem Computer-Programm Vector NTI® Suite 7.0 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit den vorgegebenen Default-Parametern erstellt.

[0021] 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 bzw. 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 bzw. 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 bzw. 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- bzw. Homologieangaben in der vorliegenden Anmeldung aber auf die Gesamtlänge der jeweils angegebenen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz.

[0022] Es wurde festgestellt, dass ein Wasch- und Reinigungsmittel mit einer erfindungsgemäß bevorzugten Protease eine gesteigerte Reinigungsleistung gegenüber einem proteasefreien Mittel aufweist und eine sehr gute Reinigungs-

leistung im Hinblick auf protease-sensitive Anschmutzungen erreicht.

[0023] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Wasch- oder Reinigungsmittel dadurch gekennzeichnet, dass seine Reinigungsleistung mindestens derjenigen eines Wasch- bzw. Reinigungsmittels entspricht, das eine Protease gemäß SEQ ID NO. 3 beinhaltet und/oder das eine Protease gemäß SEQ ID NO. 4 beinhaltet, und/oder das eine Protease beinhaltet, die der Protease aus *Bacillus pumilus* gemäß WO2007/131656 entspricht, wobei die Reinigungsleistung in einem Waschsysteem bestimmt wird, das ein Waschmittel in einer Dosierung zwischen 4,5 und 7,0 Gramm pro Liter Waschflotte sowie die Protease enthält, wobei die zu vergleichenden Proteasen aktivitätsgleich eingesetzt sind und die Reinigungsleistung gegenüber einer oder mehrerer der Anschmutzungen Blut-Milch/Tusche auf Baumwolle, Voll-Ei/Pigment (Ganzei/Ruß) auf Baumwolle, Schokoladenmilch/Ruß auf Baumwolle, Erdnuss Öl- Pigment/Tusche auf Polyester/Baumwolle, Gras auf Baumwolle und Kakao auf Baumwolle, insbesondere gegenüber einer oder mehrerer der Anschmutzungen

- Blut-Milch/Tusche auf Baumwolle: Produkt Nr. C-05 erhältlich von CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande
- Voll-Ei/Pigment (Ganzei/Ruß) auf Baumwolle: Produkt Nr. 10N erhältlich von der Firma wfk Testgewebe GmbH; Brüggen-Bracht, Deutschland, oder Produkt C-S-37 erhältlich von CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande
- Schokoladenmilch/Ruß auf Baumwolle: Produkt Nr. C-03 erhältlich von CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande
- Erdnuss Öl-Pigment/Tusche auf Polyester/Baumwolle: Produkt Nr. PC-10 erhältlich von CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande
- Gras auf Baumwolle: Produkt Nr. 164 erhältlich von der Firma Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Schweiz
- Kakao auf Baumwolle: Produkt Nr. 112 erhältlich von der Firma Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Schweiz,

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. Erfindungsgemäß sind die Begriffe Ganzei/Ruß bzw. Vollei/Pigment hinsichtlich der Anschmutzungen als gleichwertig und einander entsprechend zu betrachten.

[0024] Ein bevorzugtes flüssiges Waschmittel für ein solches Waschsysteem 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 6,0 Gramm pro Liter Waschflotte, beispielsweise 4,7, 4,9 oder 5,9 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.

[0025] Ein bevorzugtes pulverförmiges Waschmittel für ein solches Waschsysteem 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 pulverförmigen Waschmittels zwischen 5,5 und 7,0 Gramm pro Liter Waschflotte, beispielsweise 5,6, 5,9 oder 6,7 Gramm pro Liter Waschflotte. Bevorzugt wird gewaschen in einem pH-Wertebereich zwischen pH 9 und pH 11.

[0026] Erfindungsgemäß bevorzugt wird das vorstehend genannte flüssige Waschmittel zur Bestimmung der Reinigungsleistung verwendet wie angegeben.

[0027] Der Weißheitsgrad, d.h. die Aufhellung der Anschmutzungen, als Maß für die Reinigungsleistung 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.

[0028] Durch den aktivitätsgleichen Einsatz der jeweiligen Protease 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 Reinigungsleistung an bestimmten Anschmutzungen, verglichen werden. Generell gilt, dass eine niedrige spezifische Aktivität durch Zugabe einer größeren Proteinmenge ausgeglichen werden kann. Verfahren zur Bestimmung der Proteaseaktivität sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Enzymtechnologie geläufig und werden von ihm routinemäßig angewendet. Beispielsweise sind solche Verfahren of-

fenbart in Tenside, Band 7 (1970), S. 125-132.

[0029] Alternativ kann die Protease-Aktivität über die Freisetzung des Chromophors para-Nitroanilin (pNA) aus dem Substrat suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilid (AAPF) bestimmt werden. 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). 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.

[0030] Die Proteaseaktivität wird üblicherweise in Protease-Einheiten (PE) angegeben. Geeignete Proteaseaktivitäten betragen beispielsweise 2,25, 5 oder 10 PE pro ml Waschflotte. Die Proteaseaktivität ist jedoch nicht gleich Null.

[0031] Zu erfindungsgemäßen Wasch- oder 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.

[0032] Bevorzugt enthält ein erfindungsgemäßes Mittel die Protease in einer Menge von 2 µg bis 20 mg, vorzugsweise von 5 µg bis 17,5 mg, besonders bevorzugt von 20 µg bis 15 mg und ganz besonders bevorzugt von 50 µg bis 10 mg pro g des Mittels.

[0033] Ein erfindungsgemäßes Mittel kann sowohl ein Mittel für Großverbraucher oder technische Anwender als auch ein Produkt für den Privatverbraucher sein, wobei alle im Stand der Technik etablierten Wasch- und Reinigungsmittelarten ebenfalls Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellen.

[0034] Die erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel, die als insbesondere pulverförmige Feststoffe, in nachverdichteter Teilchenform, als homogene Lösungen oder Suspensionen vorliegen können, können außer den erfindungsgemäß eingesetzten Proteasen im Prinzip alle bekannten und in derartigen Mitteln üblichen Inhaltsstoffe enthalten, wobei bevorzugt mindestens ein weiterer Inhaltsstoff in dem Mittel vorhanden ist. Die erfindungsgemäßen 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.

[0035] Insbesondere eine Kombination einer in einem erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel enthaltenen Protease mit einem oder mehreren weiteren Inhaltsstoff(en) der Mittel erweist sich als vorteilhaft, da ein solches Mittel eine verbesserte Reinigungsleistung durch sich ergebende Synergismen, insbesondere zwischen der Protease und dem weiteren Inhaltsstoff, aufweist. Dies bedeutet, dass das Mittel eine verbesserte Entfernung von Anschmutzungen, beispielsweise proteinhaltigen Anschmutzungen, bewirkt im Vergleich mit einem Mittel, welches entweder nur eine der beiden Komponenten beinhaltet, oder auch im Vergleich zur erwarteten Reinigungsleistung eines Mittels mit beiden Komponenten auf Grund der bloßen Addition der jeweiligen Einzelbeiträge dieser beiden Komponenten zur Reinigungsleistung des Mittels. Insbesondere durch die Kombination einer in einem erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel enthaltenen Protease mit einem der nachfolgend beschriebenen Tenside und/oder Buildersubstanzen und/oder Bleichmittel wird ein solcher Synergismus erreicht.

[0036] Die erfindungsgemäßen Mittel können ein Tensid oder mehrere Tenside enthalten, wobei insbesondere anionische Tenside, nichtionische Tenside und deren Gemische, aber auch kationische, zwitterionische und amphotere Tenside in Frage kommen.

[0037] 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.

[0038] 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-, Talg- 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-Alkylpolyethylenglykol-polypropylenglykolether 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-Alkylpolyethylenglykol-polybutylenglykolether mit jeweils bis zu 8 Mol Ethylenoxid- und Butylenoxideinheiten im Molekül sowie endgruppenverschlossene Alkylpolyalkylenglykolsmischether. Besonders bevorzugt sind auch die hydroxylgruppenhaltigen alkoxylierten Alkohole, wie sie in der europäischen Patentanmeldung EP 0 300 305 beschrieben sind, 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 (III), 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:



[0039] 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 (IV),



in der R³ für einen linearen oder verzweigten Alkyl- oder Alkenylrest mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, R⁴ für einen linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylrest oder einen Arylenrest mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen und R⁵ für einen linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylrest oder einen Arylrest oder einen Oxy-Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen steht, wobei C₁-C₄-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 dann beispielsweise 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 Netzeigenschaften 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-Polyhydroxy-fettsäureamide. 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.

[0040] 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.

[0041] Tenside sind in erfindungsgemäßen Mitteln in Mengenanteilen von vorzugsweise 5 Gew.-% bis 50 Gew.-%, insbesondere von 8 Gew.-% bis 30 Gew.-%, enthalten.

[0042] Ein erfindungsgemäßes Mittel 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 Methylglycindiessigsäure, Nitrilotriessigsäure und Ethylendiamintetraessigsäure sowie Polyasparaginsäure, Polyphosphonsäuren, insbesondere Aminotris(methylenphosphonsäure), Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) und 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure, polymere Hydroxyverbindungen wie Dextrin sowie polymere (Poly-)carbonsäuren, insbesondere die durch Oxidation von Polysacchariden beziehungsweise Dextrinen zugänglichen Polycarboxylate, polymere Acrylsäuren, Methacrylsäuren, Maleinsäuren und Mischpolymere aus diesen, die auch geringe Anteile polymerisierbarer Substanzen ohne Carbonsäurefunktionalität einpolymerisiert enthalten können. Die relative Molekülmasse der Homopolymeren ungesättigter Carbonsäuren liegt im allgemeinen zwischen 3 000 und 200 000, die der Copolymeren zwischen 2 000 und 200 000, vorzugsweise 30 000 bis 120 000, jeweils bezogen auf freie Säure. Ein besonders bevorzugtes Acrylsäure-Maleinsäure-Copolymer weist eine relative Molekülmasse von 30 000 bis 100 000 auf. Handelsübliche Produkte sind zum Beispiel Sokalan® CP 5, CP 10 und PA 30 der Firma BASF. 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 einem veresterten Vinylalkohol 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, wobei Maleinsäure besonders bevorzugt ist, und/oder ein Derivat einer Allylsulfonsäure, die in 2-Stellung mit einem Alkyl- oder Arylrest substituiert ist, sein. Derartige Polymere weisen im Allgemeinen eine relative Molekülmasse zwischen 1 000 und 200 000 auf. Weitere bevorzugte Copolymere sind solche, die als Monomere vorzugsweise 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.

[0043] 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, erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzt.

[0044] Als wasserlösliche anorganische Buildermaterialien kommen insbesondere Alkalisilikate, Alkalicarbonate und Alkaliphosphate, die in Form ihrer alkalischen, neutralen oder sauren Natrium- oder Kaliumsalze vorliegen können, in Betracht. Beispiele hierfür sind Trinatriumphosphat, Tetranatriumdiphosphat, Dinatriumdihydrogendiphosphat, Penta-

5 natriumtriphosphat, sogenanntes Natriumhexametaphosphat, oligomeres Trinatriumphosphat mit Oligomerisierungsgraden von 5 bis 1000, insbesondere 5 bis 50, sowie die entsprechenden Kaliumsalze beziehungsweise Gemische aus Natrium- und Kaliumsalzen. Als wasserunlösliche, wasserdispergierbare anorganische Buildermaterialien werden insbesondere kristalline oder amorphe Alkalialumosilikate, in Mengen von bis zu 50 Gew.-%, vorzugsweise nicht über 40 Gew.-% und in flüssigen Mitteln insbesondere von 1 Gew.-% bis 5 Gew.-%, eingesetzt. Unter diesen sind die kristallinen

10 Natriumalumosilikate in Waschmittelqualität, insbesondere Zeolith A, P und gegebenenfalls X, allein oder in Mischungen, beispielsweise in Form eines Co-Kristallisats aus den Zeolithen A und X (Vegobond® AX, ein Handelsprodukt der Condea Augusta S.p.A.), 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, das nach den Angaben der deutschen Patentschrift DE 24 12 837 bestimmt werden kann, liegt in der

15 Regel im Bereich von 100 bis 200 mg CaO pro Gramm.

[0045] Geeignete Substitute beziehungsweise Teils Substitute für das genannte Alumosilikat sind kristalline Alkalisilikate, die allein oder im Gemisch mit amorphen Silikaten vorliegen können. Die in den erfindungsgemäßen Mitteln als Gerüststoffe 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

20 kristalline Silikate, die allein oder im Gemisch mit amorphen Silikaten vorliegen können, werden vorzugsweise kristalline Schichtsilikate der allgemeinen Formel Na₂Si_xO_{2x+1} · y H₂O eingesetzt, in der x, das sogenannte Modul, eine Zahl von 1,9 bis 22, insbesondere 1,9 bis 4 und y eine Zahl von 0 bis 33 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 · y H₂O) 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 erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäßer Mittel wird ein kristallines Natriumschichtsilikat mit einem Modul von 2 bis 3 eingesetzt, wie es aus Sand und Soda hergestellt werden kann. Kristalline Natriumsilikate mit einem Modul im Bereich von

30 1,9 bis 3,5 werden in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäßer Mittel eingesetzt. Kristalline schichtförmige Silikate der oben angegebenen Formel (I) werden von der Fa. Clariant GmbH unter dem Handelsnamen Na-SKS vertrieben, z.B. Na-SKS-1 (Na₂Si₂₂O₄₅·xH₂O, Kenyait), Na-SKS-2 (Na₂Si₁₄O₂₉·xH₂O, Magadiit), Na-SKS-3 (Na₂Si₈O₁₇·xH₂O) oder Na-SKS-4 (Na₂Si₄O₉·xH₂O, Makatit). Von diesen eignen sich vor allem Na-SKS-5 (α-Na₂Si₂O₅), Na-SKS-7 (β-Na₂Si₂O₅, Natrosilit), Na-SKS-9 (NaHSi₂O₅·3H₂O), Na-SKS-10 (NaHSi₂O₅·3H₂O, Kanemit), Na-SKS-11 (t-Na₂Si₂O₅) und Na-SKS-13 (NaHSi₂O₅), insbesondere aber Na-SKS-6 (δ-Na₂Si₂O₅). In einer bevorzugten Ausgestaltung erfindungsgemäßer Mittel setzt man ein granulares Compound aus kristallinem Schichtsilikat und Citrat, aus kristallinem Schichtsilikat und oben genannter (co-)polymerer Polycarbonsäure, oder aus Alkalisilikat und Alkalicarbonat ein, wie es beispielsweise unter dem Namen Nabion® 15 im Handel erhältlich ist.

[0046] Buildersubstanzen sind in den erfindungsgemäßen Mitteln vorzugsweise in Mengen bis zu 75 Gew.-%, insbesondere 5 Gew.-% bis 50 Gew.-%, enthalten.

[0047] Als für den Einsatz in erfindungsgemäßen Mitteln geeignete Persauerstoffverbindungen kommen insbesondere organische Persäuren beziehungsweise persäure Salze organischer Säuren, wie Phthalimidopercapronsäure, Perbenzoesäure oder Salze der Diperdodecandisäure, Wasserstoffperoxid und unter den Waschbedingungen Wasserstoffperoxid abgebende anorganische Salze, zu denen Perborat, Percarbonat, Persilikat und/oder Persulfat wie Caroat gehören, in Betracht. 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. Falls ein erfindungsgemäßes Mittel Persauerstoffverbindungen enthält, sind diese in Mengen von vorzugsweise bis zu 50 Gew.-%, insbesondere von 5 Gew.-% bis 30 Gew.-%, vorhanden. Der Zusatz geringer Mengen bekannter Bleichmittelstabilisatoren wie beispielsweise von Phosphonaten, Boraten beziehungsweise Metaboraten und Metasilikaten sowie Magnesiumsalzen wie Magnesiumsulfat kann zweckdienlich sein.

[0048] Als Bleichaktivatoren können Verbindungen, die unter Perhydrolysebedingungen aliphatische Peroxocarbonsäuren mit vorzugsweise 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere 2 bis 4 C-Atomen, und/oder gegebenenfalls substituierte Perbenzoesäure ergeben, eingesetzt werden. Geeignet sind Substanzen, die O- und/oder N-Acylgruppen der genannten C-Atomzahl und/oder gegebenenfalls substituierte Benzoylgruppen tragen. Bevorzugt sind mehrfach acylierte Alkylen-

55 diamine, insbesondere Tetraacetyl ethylendiamin (TAED), acylierte Triazinderivate, insbesondere 1,5-Diacetyl-2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazin (DADHT), acylierte Glykolorile, insbesondere Tetraacetyl glykoloril (TAGU), N-Acylimide, insbesondere N-Nonanoylsuccinimid (NOSI), acylierte Phenolsulfonate, insbesondere n-Nonanoyl- oder Isononanoyloxybenzolsulfonat (n- bzw. iso-NOBS), Carbonsäureanhydride, insbesondere Phthalsäureanhydrid, acylierte mehrwertige

Alkohole, insbesondere Triacetin, Ethylenglykoldiacetat, 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran und Enolester sowie acetyliertes Sorbitol und Mannitol beziehungsweise deren beschriebene Mischungen (SORMAN), acylierte Zuckerderivate, insbesondere Pentaacetylglukose (PAG), Pentaacetylfructose, Tetraacetylxylose und Octaacetylactose sowie acetyliertes, gegebenenfalls N-alkyliertes Glucamin und Gluconolacton, und/oder N-acylierte Lactame, beispielsweise N-Benzoylcaprolactam. Die hydrophil substituierten Acylacetale und die Acyllactame werden ebenfalls bevorzugt eingesetzt. Auch Kombinationen konventioneller Bleichaktivatoren können eingesetzt werden. Derartige Bleichaktivatoren können, insbesondere bei Anwesenheit obengenannter Wasserstoffperoxid-liefernder Bleichmittel, im üblichen Mengenbereich, vorzugsweise in Mengen von 0,5 Gew.-% bis 10 Gew.-%, insbesondere 1 Gew.-% bis 8 Gew.-%, bezogen auf gesamtes Mittel, enthalten sein, fehlen bei Einsatz von Percarbonsäure als alleinigem Bleichmittel jedoch vorzugsweise ganz.

[0049] Zusätzlich zu den konventionellen Bleichaktivatoren oder an deren Stelle können auch Sulfonylamine und/oder bleichverstärkende Übergangsmetallsalze beziehungsweise Übergangsmetallkomplexe als sogenannte Bleichkatalysatoren enthalten sein.

[0050] Zu den in den erfindungsgemäßen Mitteln, 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, Dirole mit 2 bis 4 C-Atomen, insbesondere Ethylenglykol und Propylenglykol, sowie deren Gemische und die aus den genannten Verbindungsklassen-ableitbaren Ether. Derartige wasser-mischbare Lösungsmittel sind in den erfindungsgemäßen Mitteln vorzugsweise in Mengen nicht über 30 Gew.-%, insbesondere von 6 Gew.-% bis 20 Gew.-%, vorhanden.

[0051] 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, Glutarsäure 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.

[0052] 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.

[0053] Erfindungsgemäße Textilwaschmittel 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-sulfostryl)-diphenyls, 4,4'-Bis(4-chlor-3-sulfostryl)-diphenyls, oder 4-(4-Chlorstyryl)-4'-(2-sulfostryl)-diphenyls. Auch Gemische der vorgenannten optischen Aufheller können verwendet werden.

[0054] 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 Silikon, 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.

[0055] 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 Wasch- und Reinigungsmittel in Bereichen von 10°C über 40°C und 60°C bis hin zu 95° bei maschinellen Mitteln oder bei technischen Anwendungen. Da bei modernen Wasch- und Spülmaschinen die Temperatur meist stufenlos einstellbar ist, sind auch alle Zwischenstufen der Temperatur eingeschlossen. Vorzugsweise werden die Inhaltsstoffe der betreffenden Mittel aufeinander abgestimmt. Bevorzugt sind Synergien hinsichtlich der Reinigungsleistung. Besonders bevorzugt sind Synergien, die in einem Temperaturbereich zwischen 10°C und 60°C vorhanden sind, insbesondere in einem Temperaturbereich von 10°C bis 60°C, 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.

[0056] Die Herstellung erfindungsgemäßer 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 erfindungsgemäßer Mittel mit erhöhtem Schüttgewicht, insbesondere im Bereich von 650 g/l bis 950 g/l, ist ein in einen Extrusionschritt aufweisendes Verfahren bevorzugt.

[0057] Zur Herstellung von erfindungsgemäßen 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 beispielsweise der Geschirrspülmaschine eingebracht werden, ist abhängig von der Geometrie und dem Volumen dieser Dosiervorrichtung. Beispielhaft bevorzugte Ausführungsformen weisen eine Grundfläche von (20 bis 30 mm) x (34 bis 40 mm), insbesondere von 26x36 mm oder von 24x38 mm auf.

[0058] Flüssige beziehungsweise pastöse erfindungsgemäße 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.

[0059] Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen somit alle festen, pulverförmigen, flüssigen, gelförmigen oder pastösen Darreichungsformen der Mittel, die gegebenenfalls auch aus mehreren Phasen bestehen können sowie in komprimierter oder nicht komprimierter Form vorliegen können. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellen daher Mittel dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie als Einkomponentensystem vorliegen. Solche Mittel bestehen bevorzugt aus einer Phase. Dagegen sind Mittel, die aus mehreren Phasen bestehen, dadurch gekennzeichnet sind, dass es in mehrere Komponenten aufgeteilt ist. Zu den erfindungsgemäßen festen Darreichungsformen zählen ferner Extrudate, Granulate, Tabletten oder Pouches, die sowohl in Großbinden als auch portionsweise abgepackt vorliegen können.

[0060] Ein erfindungsgemäßes 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.

[0061] Alternativ können erfindungsgemäße Mittel auch flüssig, gelförmig oder pastös sein. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist daher dadurch gekennzeichnet, dass das Wasch- oder Reinigungsmittel in flüssiger, gelförmiger oder pastöser Form vorliegt, insbesondere in Form eines nicht-wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer nicht-wässrigen Paste oder in Form eines wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer wasserhaltigen Paste.

[0062] Das erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel kann in einem Behältnis, vorzugsweise einem luftdurchlässigen Behältnis, verpackt sein, aus dem es kurz vor Gebrauch oder während des Waschvorgangs freigesetzt wird. Insbesondere kann die in dem Mittel enthaltene 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 die Protease mit einer bei Raumtemperatur und/oder bei Abwesenheit von Wasser für die Protease undurchlässigen Substanz umhüllt ist.

[0063] Erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel können ausschließlich eine Protease enthalten wie beschrieben. Alternativ können sie auch weitere hydrolytische Enzyme oder andere Enzyme in einer für die Wirksamkeit des Mittels zweckmäßigen Konzentration enthalten. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen somit Mittel dar, die ferner eines oder mehrere weitere Enzyme umfassen, 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 erfindungsgemäßen Mittel eine katalytische Aktivität entfalten können, insbesondere eine insbesondere eine Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, β -Glucosidase, Carrageenase, Perhydrolase, Oxidase, Oxidoreduktase oder eine Lipase, 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.

[0064] Erfindungsgemäße Mittel enthalten Enzyme vorzugsweise in Gesamtmengen 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

erfindungsgemäßen Mitteln enthalten, wobei jedes enthaltene Enzym in den genannten Mengenverhältnissen vorliegen kann. Die Enzyme können an Trägerstoffen adsorbiert und/oder in Hüllsubstanzen eingebettet sein, um sie gegen vorzeitige Inaktivierung zu schützen.

[0065] Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe bekannter Methoden, zum Beispiel dem BCA-Verfahren (Bicinchoninsäure; 2,2'-Bichinoly-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.

[0066] Bei dem Vergleich der Leistungen zweier Waschmittelenzyme muss zwischen proteingleichem und aktivitätsgleichem Einsatz unterschieden werden. Insbesondere bei gentechnisch erhaltenen, weitgehend nebenaktivitätsfreien Präparationen ist der proteingleiche Einsatz angebracht. Denn damit ist eine Aussage darüber möglich, ob dieselben Proteinmengen - als Maß für den Ertrag der fermentativen Produktion - zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Klaffen die jeweiligen Verhältnisse von Aktivsubstanz zu Gesamtprotein (die Werte der spezifischen Aktivität) auseinander, so ist ein aktivitätsgleicher Vergleich zu empfehlen, weil hierüber die jeweiligen enzymatischen Eigenschaften verglichen werden. Generell gilt, daß eine niedrige spezifische Aktivität durch Zugabe einer größeren Proteinmenge ausgeglichen werden kann.

[0067] 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. Ganz besonders bevorzugt liegt ein solcher Synergismus vor zwischen der erfindungsgemäß enthaltenen Protease und einem weiteren Enzym eines erfindungsgemäßen Mittels, darunter insbesondere zwischen der genannten Protease und einer Amylase und/oder einer Mannanase und/oder einer Lipase. Synergistische Effekte können nicht nur zwischen verschiedenen Enzymen, sondern auch zwischen einem oder mehreren Enzymen und weiteren Inhaltsstoffen des erfindungsgemäßen Mittels auftreten.

[0068] 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 lentus*, 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 unter den Handelsnamen Esperase®, beziehungsweise Savinase® von der Firma Novozymes vertrieben. Von der Protease aus *Bacillus lentus* 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 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 offenbart sind in den internationalen Patentanmeldungen WO2008/086916 und WO2007/131656.

[0069] Beispiele für erfindungsgemäß konfektionierbare 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.

[0070] Desweiteren sind für diesen Zweck die α -Amylase aus *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) und die Cyclodextrin-Glucanotransferase (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.

[0071] 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.

[0072] Beispiele für erfindungsgemäß konfektionierbare 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. Desweiteren 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.

[0073] Erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel können ferner Cellulasen enthalten, 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. Zu diesen Leistungsaspekten zählen insbesondere Beiträge zur Primärwaschleistung, zur Sekundärwaschleistung des Mittels (Antiredepositionswirkung oder Vergrauungsinhibition) und Avivage (Gewebewirkung), bis hin zum Ausüben eines "stone washed"-Effekts.

[0074] 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.

[0075] 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, Xyloglucanasen (=Xylanasen), Pullulanasen und β -Glucanasen. Diesbezüglich geeignete Enzyme sind beispielsweise unter den Namen Gamanase® und Pektinex AR® von der Firma Novozymes, unter dem Namen Rohapec® B1 L 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.

[0076] Zur Erhöhung der bleichenden Wirkung können erfindungsgemäße Mittel auch Oxidoreduktasen, beispielsweise Oxidasen, Oxygenasen, Katalasen (die bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen als Peroxidase reagieren), Peroxidasen, wie Halo-, Chloro-, Bromo-, Lignin-, Glucose- oder Manganperoxidasen, Dioxygenasen oder Laccasen (Phenoloxidasen, Polyphenoloxidasen) enthalten. Als geeignete Handelsprodukte sind Denilite® 1 und 2 der Firma Novozymes zu nennen. Als vorteilhaft einsetzbare Beispielsysteme für eine enzymatische Perhydrolyse wird auf die Anmeldungen WO 98/45398 A1, WO 2005/056782 A2 sowie WO 2004/058961 A1 verwiesen. Ein kombiniertes enzymatisches Bleichsystem, umfassend eine Oxidase und eine Perhydrolase beschreibt die Anmeldung WO 2005/124012. Vorteilhafterweise werden zusätzlich vorzugsweise organische, besonders bevorzugt aromatische, mit den Enzymen wechselwirkende Verbindungen zugegeben, um die Aktivität der betreffenden Oxidoreduktasen zu verstärken (Enhancer) oder um bei stark unterschiedlichen Redoxpotentialen zwischen den oxidierenden Enzymen und den Anschmutzungen den Elektronenfluß zu gewährleisten (Mediatoren).

[0077] Die erfindungsgemäß eingesetzten Enzyme stammen entweder ursprünglich aus Mikroorganismen, etwa der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, oder *Pseudomonas*, und/oder werden nach an sich bekannten biotechnologischen Verfahren durch geeignete Mikroorganismen produziert, etwa durch transgene Expressionswirte der Gattungen *Bacillus* oder durch filamentöse Fungi.

[0078] Die Aufreinigung der betreffenden Enzyme erfolgt günstigerweise über an sich etablierte Verfahren, beispielsweise über Ausfällung, Sedimentation, Konzentrierung, Filtration der flüssigen Phasen, Mikrofiltration, Ultrafiltration, Einwirken von Chemikalien, Desodorierung oder geeignete Kombinationen dieser Schritte.

[0079] Analog den oben gemachten Ausführungen können die Enzyme zusammen mit Begleitstoffen, etwa aus der Fermentation oder mit Stabilisatoren erfindungsgemäß konfektioniert werden.

[0080] Unter all diesen Enzymen sind solche besonders bevorzugt, die an sich gegenüber einer Oxidation vergleichsweise stabil oder beispielsweise Mutationen, insbesondere durch Substitution, Deletion oder Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren, 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.

[0081] Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittels zur Entfernung von Anschmutzungen, insbesondere von protease-sensitiven Anschmutzungen, auf Textilien oder harten Oberflächen, d.h. zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen, dar.

[0082] Denn erfindungsgemäße Mittel können, insbesondere auf Grund der vorstehend beschriebenen Eigenschaften der enthaltenen Protease, vorteilhaft dazu verwendet werden, um von Textilien oder von harten Oberflächen entsprechende Verunreinigungen zu beseitigen. Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes stellen beispielsweise die Handwäsche, die manuelle Entfernung von Flecken von Textilien oder von harten Oberflächen oder die Verwendung im Zusammenhang mit einem maschinellen Verfahren dar.

[0083] Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel 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.

[0084] In bevorzugten Ausführungsformen dieser Verwendung werden die betreffenden erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel nach einer der beschriebenen Ausführungsformen bereitgestellt.

[0085] Einen weiteren Erfindungsgegenstand stellen Verfahren zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen dar, bei denen wenigstens in einem der Verfahrensschritte ein erfindungsgemäßes Wasch- oder Reinigungsmittel verwendet wird. Das Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen ist demnach dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein erfindungsgemäßes Wasch- oder Reinigungsmittel angewendet ist.

[0086] Hierunter fallen sowohl manuelle als auch maschinelle Verfahren, wobei maschinelle Verfahren aufgrund ihrer präziseren Steuerbarkeit, was beispielsweise die eingesetzten Mengen und Einwirkzeiten angeht, bevorzugt sind.

[0087] 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 bzw. Verdünnung dieses Mittels behandelt wird. Entsprechendes gilt für Verfahren zur Reinigung von allen anderen Materialien als Textilien, insbesondere von harten Oberflächen. Alle denkbaren Wasch- oder Reinigungsverfahren können in wenigstens einem der Verfahrensschritte um die Anwendung eines erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittels bereichert werden und stellen dann Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar.

[0088] Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel 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 vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren gilt.

[0089] Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass in mindestens einem Verfahrensschritt eine Protease katalytisch aktiv ist, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 97,5% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 98%, 98,1%, 98,2%, 98,3%, 98,4%, 98,5%, 98,6%, 98,7%, 98,8%, 98,9%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere derart, dass die Protease in einer Menge von 40 µg bis 4 g, vorzugsweise von 50 µg bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 1 g pro Anwendung eingesetzt ist. Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel 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 vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren gilt.

[0090] Da die in erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzten Proteasen natürlicherweise bereits eine hydrolytische Aktivität besitzen und diese auch in Medien entfalten, die sonst keine Reinigungskraft besitzen wie beispielsweise in bloßem Puffer, kann ein einzelner und/oder der einzige Schritt eines solchen Verfahrens darin bestehen, dass gewünschtenfalls als einzige reinigungsaktive Komponente eine solche Protease mit der Anschmutzung in Kontakt gebracht wird, bevorzugt in einer Pufferlösung oder in Wasser. Dies stellt eine weitere Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstandes dar.

[0091] Alternative Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes stellen auch Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen oder zur Textilpflege dar, bei denen in wenigstens einem Verfahrensschritt eine in erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzte Protease aktiv wird. Hierunter sind Verfahren für Textilrohstoffe, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen bevorzugt, und ganz besonders für solche mit Wolle oder Seide.

[0092] Es kann sich dabei beispielsweise um Verfahren handeln, in denen Materialien zur Verarbeitung in Textilien vorbereitet werden, etwa zur Antifilzausrüstung, oder beispielsweise um Verfahren, welche die Reinigung getragener Textilien um eine pflegende Komponente bereichern. Wegen der oben beschriebenen Wirkung von Proteasen auf natürliche, proteinhaltige Rohstoffe handelt es sich in bevorzugten Ausführungsformen um Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen, insbesondere mit Wolle oder Seide.

[0093] In erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzte Proteasen sind entsprechend der vorstehenden Ausführungen vor-

teilhaft in erfindungsgemäßen Wasch- und Reinigungsmitteln sowie Verfahren, insbesondere Wasch- und Reinigungs-
verfahren, einsetzbar. Sie können also dazu verwendet werden, um von Textilien oder von harten Oberflächen prote-
inhaltige bzw. protease-sensitive Anschmutzungen zu beseitigen.

[0094] Einen weiteren Gegenstand der Erfindung bildet daher die Verwendung einer Protease, die eine Aminosäure-
sequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 97,5% und zunehmend
bevorzugt zu mindestens 98%, 98,1%, 98,2%, 98,3%, 98,4%, 98,5%, 98,6%, 98,7%, 98,8%, 98,9%, 99%, 99,1%, 99,2%,
99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, zur Reinigung
von Textilien oder von harten Oberflächen. Bevorzugt wird die Protease in einer Menge von 40 µg bis 4 g, vorzugsweise
von 50 µg bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 1 g pro
Anwendung eingesetzt. Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für erfindungsgemäße Wasch-
oder Reinigungsmittel 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. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Verwendung
werden die betreffenden Enzyme im Rahmen eines erfindungsgemäßen Wasch- beziehungsweise Reinigungsmittels
bereitgestellt.

Beispiele

[0095] Alle molekularbiologischen Arbeitsschritte folgen Standardmethoden, wie sie beispielsweise in dem Handbuch
von Fritsch, Sambrook und Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press,
New York, 1989, oder vergleichbaren einschlägigen Werken angegeben sind. Enzyme und Baukästen (Kits) wurden
nach den Angaben der jeweiligen Hersteller eingesetzt.

Beispiel 1

[0096] Isolierung und Identifizierung des proteolytisch aktiven Bakterienstamms 0,1g einer Bodenprobe wurden in 1ml
sterilen 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert und auf milchpulverhaltigen Agarplatten (1,5% Agar, 0,1% K₂HPO₄, 0,5%
Hefeextrakt, 1 % Pepton, 1 % Milchpulver, 0,02% MgSO₄*7H₂O, 0,4% Na₂CO₃, pH 10) ausplattiert und bei 30°C inkubiert.
Anhand eines Klärungshofes wurde ein proteolytisch aktives Bakterium isoliert, welches von der Deutschen Sammlung
von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) als *Bacillus pumilus* identifiziert wurde (ID 08-101).

Beispiel 2

Isolierung und Klonierung der neuen Serinprotease aus dem Boden

[0097] Das proteolytisch aktive Bakterium wurde in TBY-Medium (0,5% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1 % Trypton, pH 7,4)
für 16h bei 30°C kultiviert. Die Gesamt-DNA dieses Bakteriums wurde nach Standardmethoden präpariert, mit dem
Restriktionsenzym Sau 3A behandelt und in einen Bacillusvektor (Derivat des pBC16; Bernhard et al. (1978), J. Bacteriol.,
Band 133 (2), S. 897 ff.) kloniert. Dieser Vektor wurde in den Protease-negativen Wirtstamm *Bacillus subtilis* DB 104
(Kawamura und Doi (1984), J. Bacteriol., Band 160 (1), S. 442-444) transformiert.

[0098] Die Transformanten wurden zunächst auf DM3-Medium regeneriert und dann auf milchpulverhaltige Agarplat-
ten (TBY-Skimmilch-Platten; siehe Beispiel 1) überimpft. Proteolytisch aktive Klone wurden anhand ihrer Lysehöfe iden-
tifiziert. Aus den erhaltenen proteolytisch aktiven Klonen wurde einer ausgewählt, dessen Plasmid (Vektor) isoliert und
das in diesem Vektor enthaltene Genfragment (Insert) nach Standardmethoden sequenziert.

[0099] Das Insert enthält einen offenen Leserahmen von ca. 1,2 kb, dessen DNA-Sequenz für eine Protease vom
Subtilisin-Typ codiert. Die Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert, in der E.coli Vektor pUC19 kloniert und gemäß dem
Budapester Vertrag bei der DSMZ unter der Nummer DSM 21890 hinterlegt.

Beispiel 3

Ermittlung der Reinigungsleistung eines die Protease enthaltenden handelsüblichen flüssigen Waschmittels

[0100] Für dieses Beispiel wurden standardisiert verschmutzte Textilien eingesetzt, die von der EMPA Testmaterialien
AG (St. Gallen, Schweiz), der wfk Testgewebe GmbH (Brüggen-Bracht, Deutschland) oder dem Center For Testmaterials
(CFT, Vlaardingen, Niederlande) bezogen worden waren. Dabei wurden folgende Anschmutzungen und Textilien ver-
wendet:

A: Gras auf Baumwolle: Produkt Nr. 164 von der Firma Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testma-

terialien AG, St. Gallen, Schweiz;

B: Erdnuss Öl-Pigment/Tusche auf Polyester/Baumwolle: Produkt Nr. PC-10 von CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande;

C: Schokoladenmilch/Ruß auf Baumwolle: Produkt Nr. C-03 von CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande;

D: Blut-Milch/Tusche auf Baumwolle: Produkt Nr. C-05 erhältlich von CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Niederlande

[0101] Mit diesem Testmaterial wurden verschiedene Waschmittelrezepturen auf ihre Reinigungsleistung hin untersucht. Dafür wurden die Ansätze für 60 Minuten bei einer Temperatur von 40°C gewaschen. Die Dosierung lag bei 5,9 g des Waschmittels pro Liter Waschflotte. Es wurde mit Stadtwasser mit einer Wasserhärte von etwa 16° deutscher Härte gewaschen.

[0102] Als Kontroll-Waschmittel diente eine Waschmittel-Basis-Rezeptur folgender Zusammensetzung (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. Die Waschmittel-Basis-Rezeptur wurde für die verschiedenen Versuchsreihen aktivitätsgleich (5 PE/ml Endkonzentration) mit folgenden Proteasen versetzt: Protease umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 3 (Ansatz 1), Protease aus *Bacillus pumilus* gemäß WO2007/131656 (Ansatz 2) und leistungsverbesserte Variante F49 der Protease aus *Bacillus lentus* gemäß WO 95/23221 (Ansatz 3).

[0103] Nach dem Waschen wurde der Weißheitsgrad der gewaschenen Textilien gemessen. Die Messung erfolgte an einem Spektrometer Minolta CM508d (Lichtart D65, 10°). Das Gerät wurde zuvor mit einem mitgelieferten Weißstandard kalibriert. Die erhaltenen Ergebnisse sind die Differenzremissionen zwischen einem Waschvorgang mit einem Waschmittel enthaltend eine Protease und einem parallel durchgeführten Kontrollwaschgang mit einem Waschmittel ohne Protease. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengestellt und erlauben einen unmittelbaren Rückschluss auf den Beitrag des jeweils enthaltenen Enzyms zur Reinigungsleistung des verwendeten Mittels.

Tabelle 1: Waschergebnisse mit einem flüssigen Waschmittel bei 40°C

Anschmutzung	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
A	6,5	4,5	4,8
B	9,1	7,8	8,5
C	7,2	4,3	5,7
D	18,4	15,5	16,6

[0104] Es wird deutlich, dass ein erfindungsgemäßes Waschmittel eine bessere Reinigungsleistung zeigt im Vergleich zu einem Waschmittel mit einer Protease aus *Bacillus pumilus*, die eine ähnliche Aminosäuresequenz aufweist, sowie selbst im Vergleich mit einem Waschmittel, das eine bereits leistungsverbesserte Proteasevariante enthält, die kein Wildtyp-Molekül ist.

Patentansprüche

1. Wasch- oder Reinigungsmittel umfassend eine Protease, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 97,5% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 98%, 98,1%, 98,2%, 98,3%, 98,4%, 98,5%, 98,6%, 98,7%, 98,8%, 98,9%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, sowie mindestens einen weiteren Waschmittelinhaltsstoff.

2. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der weitere Waschmittelinhaltsstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 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.

3. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** es in fester Form vorliegt, insbesondere als rieselfähiges Pulver mit einem Schüttgewicht von 300 g/l bis 1200 g/l, insbesondere 500 g/l bis 900 g/l, vorliegt.
- 5 4. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** es in flüssiger, gelförmiger oder pastöser Form vorliegt.
5. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Protease mit einer bei Raumtemperatur und/oder bei Abwesenheit von Wasser für die Protease undurchlässigen Substanz umhüllt ist.
- 10 6. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** es mindestens ein weiteres Enzym umfasst, insbesondere eine Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, β -Glucosidase, Carrageenase, Perhydrolase, Oxidase, Oxidoreduktase oder eine Lipase, sowie vorzugsweise deren Gemische.
- 15 7. Verwendung eines Wasch- oder Reinigungsmittels nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Entfernung von protease-sensitiven Ansammlungen auf Textilien oder harten Oberflächen.
- 20 8. Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, **dadurch gekennzeichnet, dass** in mindestens einem Verfahrensschritt ein Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6 angewendet ist.
9. Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, **dadurch gekennzeichnet, dass** in mindestens einem Verfahrensschritt eine Protease katalytisch aktiv ist, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 97,5% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 98%, 98,1%, 98,2%, 98,3%, 98,4%, 98,5%, 98,6%, 98,7%, 98,8%, 98,9%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, insbesondere derart, dass die Protease in einer Menge von 40 μ g bis 4 g, vorzugsweise von 50 μ g bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 μ g bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 μ g bis 1 g pro Anwendung eingesetzt ist.
- 25 10. Verwendung einer Protease, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 97,5% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 98%, 98,1%, 98,2%, 98,3%, 98,4%, 98,5%, 98,6%, 98,7%, 98,8%, 98,9%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen, insbesondere derart, dass die Protease in einer Menge von 40 μ g bis 4 g, vorzugsweise von 50 μ g bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 μ g bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 μ g bis 1 g pro Anwendung eingesetzt ist.
- 30 35

Claims

1. A washing or cleaning agent encompassing a protease that comprises an amino acid sequence that is at least 97.5%, and increasingly preferably at least 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, and very particularly 100% identical to the amino acid sequence indicated in SEQ ID NO.3, as well as at least one further washing-agent ingredient.
- 45 2. The washing or cleaning agent according to Claim 1, **characterized in that** the further washing-agent ingredient is selected from the group consisting of builder substances, surface-active surfactants, bleaching agents based on organic and/or inorganic peroxygen compounds, bleach activators, water-miscible organic solvents, enzymes, sequestering agents, electrolytes, pH regulators, and further adjuvants such as optical brighteners, anti-gray agents, foam regulators, as well as dyes and scents, and combinations thereof.
- 50 3. The washing or cleaning agent according to one of Claims 1 or 2, **characterized in that** it is present in solid form, in particular as a pourable powder having a bulk weight from 300 g/l to 1200 g/l, in particular 500 g/l to 900 g/l.
- 55 4. The washing or cleaning agent according to one of Claims 1 or 2, **characterized in that** it is present in liquid, gel, or paste form.

5. The washing or cleaning agent according to one of Claims 1 to 4, **characterized in that** the protease is encased with a substance that is impermeable to the protease at room temperature and/or in the absence of water.
6. The washing or cleaning agent according to one of Claims 1 to 5, **characterized in that** it comprises at least one further enzyme, in particular a protease, amylase, cellulase, hemicellulase, mannanase, tannase, xylanase, xanthanase, β -glucosidase, carrageenase, perhydrolase, oxidase, oxidoreductase, or a lipase, as well as preferably mixtures thereof.
7. Use of a washing or cleaning agent according to one of Claims 1 to 6 to remove protease-sensitive stains on textiles or hard surfaces.
8. A method for cleaning textiles or hard surfaces, **characterized in that** in at least one method step, a washing or cleaning agent according to one of Claims 1 to 6 is utilized.
9. A method for cleaning textiles or hard surfaces, **characterized in that** in at least one method step, a protease that comprises an amino acid sequence that is at least 97.5%, and increasingly preferably at least 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, and very particularly 100% identical to the amino acid sequence indicated in SEQ ID NO.3, is catalytically active, in particular in such a way that the protease is used in a quantity from 40 μ g to 4 g, by preference from 50 μ g to 3 g, particularly preferably from 100 μ g to 2 g, and very particularly preferably from 200 μ g to 1 g per use.
10. Use of a protease that comprises an amino acid sequence that is at least 97.5%, and increasingly preferably at least 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, and very particularly 100% identical to the amino acid sequence indicated in SEQ ID NO.3, to clean textiles or hard surfaces, in particular in such a way that the protease is used in a quantity from 40 μ g to 4 g, by preference from 50 μ g to 3 g, particularly preferably from 100 μ g to 2 g, and very particularly preferably from 200 μ g to 1 g per use.

Revendications

1. Agent de lavage ou de nettoyage comprenant une protéase qui comprend une séquence d'acides aminés qui est identique à la séquence d'acides aminés indiquée dans la SEQ ID NO: 3 à concurrence d'au moins 97,5 % et de manière plus préférée à concurrence d'au moins 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, et de manière tout particulièrement préférée à concurrence de 100 %, ainsi qu'au moins un constituant d'agent de lavage supplémentaire.
2. Agent de lavage ou de nettoyage selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** le constituant d'agent de lavage supplémentaire est choisi parmi le groupe constitué par des substances faisant office de builders, des agents tensioactifs, des agents de blanchiment à base de composés de peracides organiques et/ou inorganiques, des activateurs du blanchiment, des solvants organiques miscibles à l'eau, des enzymes, des agents de séquestration, des électrolytes, des régulateurs du pH et d'autres adjuvants tels que des azurants optiques, des inhibiteurs du grisaillement, des régulateurs de mousse ainsi que des colorants et des parfums, de même que leurs combinaisons.
3. Agent de lavage ou de nettoyage selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, **caractérisé en ce qu'il** est présent sous forme solide, en particulier sous la forme d'une poudre apte à l'écoulement possédant un poids volumique apparent de 300 g/l à 1200 g/l, en particulier de 500 g/l à 900 g/l.
4. Agent de lavage ou de nettoyage selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, **caractérisé en ce qu'il** est présent sous forme liquide, sous la forme d'un gel ou sous la forme d'une pâte.
5. Agent de lavage ou de nettoyage selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisé en ce que** la protéase est enrobée d'une substance imperméable pour la protéase à la température ambiante et/ou en l'absence d'eau.
6. Agent de lavage ou de nettoyage selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, **caractérisé en ce qu'il** comprend au moins une enzyme supplémentaire, en particulier une protéase, une amylase, une cellulase, une hémicellulase,

une mannanase, une tannase, une xylanase, une xanthanase, une β -glucosidase, une carraghénase, une perhydrolase, une oxydase, une oxydoréductase ou une lipase, ainsi que, de préférence leurs mélanges.

7. Utilisation d'un agent de lavage ou de nettoyage selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour l'élimination de saletés sensibles aux protéases sur des textiles ou sur des surfaces dures.
8. Procédé pour le nettoyage de textiles ou de surfaces dures, **caractérisé par le fait que**, dans au moins une étape opératoire, on utilise un agent de lavage ou de nettoyage selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
9. Procédé pour le nettoyage de textiles ou de surfaces dures, **caractérisé par le fait que**, dans au moins une étape opératoire, une protéase est active du point de vue catalytique, qui comprend une séquence d'acides aminés qui est identique à la séquence d'acides aminés indiquée dans la SEQ ID NO: 3 à concurrence d'au moins 97,5 % et de manière plus préférée à concurrence d'au moins 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, et de manière tout particulièrement préférée à concurrence de 100 %, en particulier de telle sorte que l'on met en oeuvre la protéase en une quantité de 40 μ g à 4 g, de préférence de 50 μ g à 3 g, de manière particulièrement préférée de 100 μ g à 2 g et de manière tout particulièrement préférée de 200 μ g à 1 g par utilisation.
10. Utilisation d'une protéase qui comprend une séquence d'acides aminés qui est identique à la séquence d'acides aminés indiquée dans la SEQ ID NO: 3 à concurrence d'au moins 97,5 % et de manière plus préférée à concurrence d'au moins 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, et de manière tout particulièrement préférée à concurrence de 100 %, pour le nettoyage de textiles ou de surfaces dures, en particulier de telle sorte que l'on met en oeuvre la protéase en une quantité de 40 μ g à 4 g, de préférence de 50 μ g à 3 g, de manière particulièrement préférée de 100 μ g à 2 g et de manière tout particulièrement préférée de 200 μ g à 1 g par utilisation.

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

- WO 2007131656 A [0004] [0023] [0068] [0102]
- EP 0300305 A [0038]
- DE 2412837 [0044]
- WO 2008086916 A [0068]
- WO 03002711 A2 [0070]
- WO 03054177 A2 [0070]
- WO 9845398 A1 [0076]
- WO 2005056782 A2 [0076]
- WO 2004058961 A1 [0076]
- WO 2005124012 A [0076]
- WO 9523221 A [0102]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **ALTSCHUL, S.F. ; GISH, W. ; MILLER, W. ; MYERS, E.W. ; LIPMAN, D.J.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0015]
- **ALTSCHUL, STEPHAN F. ; THOMAS L. MADDEN ; ALEJANDRO A. SCHAFFER ; JINGHUI ZHANG ; HHENG ZHANG ; WEBB MILLER ; DAVID J. LIPMAN.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0015]
- **CHENNA et al.** Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acid Research*, 2003, vol. 31, 3497-3500 [0020]
- **NOTREDAME et al.** T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 302, 205-217 [0020]
- *Tenside*, 1970, vol. 7, 125-132 [0028]
- **A.G. GORNALL ; C. S. BARDAWILL ; M.M. DAVID.** *J. Biol. Chem.*, 1948, vol. 177, 751-766 [0065]
- **FRITSCH ; SAMBROOK ; MANIATIS.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 [0095]
- **BERNHARD et al.** *J. Bacteriol.*, 1978, vol. 133 (2), 897 ff [0097]
- **KAWAMURA ; DOI.** *J. Bacteriol.*, 1984, vol. 160 (1), 442-444 [0097]