

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Juli 2008 (24.07.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/086916 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/54 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/063346

(22) Internationales Anmeldedatum:

5. Dezember 2007 (05.12.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2007 003 143.4 16. Januar 2007 (16.01.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN [DE/DE]; Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIEGERT, Petra [DE/DE]; Bachstr. 32, 42781 Haan (DE). WIELAND, Susanne [DE/DE]; Schlossstrasse 25, 41541 Dormagen-Zons (DE). ENGELSKIRCHEN, Julia [DE/DE]; Adolf-Klarenbach-Str. 20, 40589 Düsseldorf (DE). MERKEL, Marion [DE/DE]; Aachener Str. 27, 51145 Aachen (DE). MAURER, Karl-Heinz [DE/DE]; Dechenstrasse 5, 40699 Erkrath (DE). BESSLER, Cornelius [DE/DE]; Benrodestrasse 73, 40597 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

(54) Title: NOVEL ALKALINE PROTEASE FROM BACILLUS GIBSONII AND WASHING AND CLEANING AGENTS CONTAINING SAID NOVEL ALKALINE PROTEASE

(54) Bezeichnung: NEUE ALKALISCHE PROTEASE AUS BACILLUS GIBSONII UND WASCH- UND REINIGUNGSMITTEL ENTHALTEND DIESE NEUE ALKALISCHE PROTEASE

(57) Abstract: The invention relates to a novel subtilisin-type alkaline protease from Bacillus gibsonii and to sufficiently related proteins and the derivatives thereof. The invention also relates to washing and cleaning agents comprising the novel subtilisin-type alkaline protease, to the sufficiently related proteins and the derivatives thereof, to corresponding washing and cleaning methods and to their use in washing and cleaning agents and to other possible technical uses.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Alkalische Protease vom Subtilisin-Typ aus Bacillus gibsonii sowie hinreichend verwandte Proteine und deren Derivate. Sie betrifft außerdem Wasch- und Reinigungsmittel mit dieser neuen Alkalischen Protease vom Subtilisin-Typ, hinreichend verwandten Proteinen und deren Derivaten, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren und deren Verwendung in Wasch- und Reinigungsmitteln sowie weitere technische Einsatzmöglichkeiten.

WO 2008/086916 A1

„Neue Alkalische Protease aus *Bacillus gibsonii* und Wasch- und Reinigungsmittel enthaltend diese neue Alkalische Protease“

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Alkalische Protease vom Subtilisin-Typ aus *Bacillus gibsonii* sowie hinreichend verwandte Proteine und deren Derivate. Sie betrifft außerdem Wasch- und Reinigungsmittel mit dieser neuen Alkalischen Protease vom Subtilisin-Typ, hinreichend verwandten Proteinen und deren Derivaten, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren und deren Verwendung in Wasch- und Reinigungsmitteln sowie weitere technische Einsatzmöglichkeiten.

Enzyme sind etablierte aktive Inhaltsstoffe von Wasch- und Reinigungsmitteln. Proteasen bewirken dabei den Abbau proteinhaltiger Anschmutzungen auf dem Reinigungsgut, wie beispielsweise Textilien oder harten Oberflächen. Günstigenfalls ergeben sich Synergieeffekte zwischen den Enzymen und den übrigen Bestandteilen der betreffenden Mittel. Die Entwicklung von Waschmittelproteasen beruht auf natürlicherweise, vorzugsweise mikrobiell gebildeten Enzymen. Solche werden über an sich bekannte Mutagenese-Verfahren, beispielsweise Punktmutagenese, Deletion, Insertion oder Fusion mit anderen Proteinen oder Proteinteilen oder über sonstige Modifikationen für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln optimiert. Unter den Wasch- und Reinigungsmittelproteasen nehmen Subtilisine aufgrund ihrer günstigen enzymatischen Eigenschaften wie Stabilität oder pH-Optimum eine herausragende Stellung ein.

Proteasen vom Subtilisin-Typ (Subtilasen, Subtilopeptidasen, EC 3.4.21.62), insbesondere Subtilisine werden aufgrund der katalytisch wirksamen Aminosäuren den Serin-Proteasen zugerechnet. Sie werden natürlicherweise von Mikroorganismen, insbesondere von *Bacillus*-Spezies gebildet und sekretiert. Sie wirken als unspezifische Endopeptidasen, das heißt sie hydrolysieren beliebige Säureamidbindungen, die im Inneren von Peptiden oder Proteinen liegen. Ihr pH-Optimum liegt meist im deutlich alkalischen Bereich. Einen Überblick über diese Familie bietet beispielsweise der Artikel "Subtilases: Subtilisin-like Proteases" von R. Siezen, Seite 75-95 in "Subtilisin enzymes", herausgegeben von R. Bott und C. Betzel, New York, 1996. Subtilisine eignen sich für eine Vielzahl von technischen Verwendungsmöglichkeiten, als Bestandteile von Kosmetika und insbesondere als aktive Inhaltsstoffe von Wasch- oder Reinigungsmitteln.

Im folgenden werden die wichtigsten Subtilisine und die wichtigsten Strategien für ihre technische Weiterentwicklung aufgeführt.

Das Subtilisin BPN', welches aus *Bacillus amyloliquefaciens*, beziehungsweise *B. subtilis* stammt, ist aus den Arbeiten von Vasantha *et al.* (1984) in *J. Bacteriol.*, Volume 159, S. 811-819 und von J. A. Wells *et al.* (1983) in *Nucleic Acids Research*, Volume 11, S. 7911-7925 bekannt. Subtilisin BPN' dient insbesondere hinsichtlich der Numerierung der Positionen als Referenzenzym der Subtilisine.

Die Protease Subtilisin Carlsberg wird in den Publikationen von E. L. Smith *et al.* (1968) in *J. Biol. Chem.*, Volume 243, S. 2184-2191, und von Jacobs *et al.* (1985) in *Nucl. Acids Res.*, Band 13, S. 8913-8926 vorgestellt. Sie wird natürlicherweise von *Bacillus licheniformis* gebildet und ist unter dem Handelsnamen Maxatase[®] von der Firma Genencor International Inc., Rochester, New York, USA, sowie unter dem Handelsnamen Alcalase[®] von der Firma Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark, erhältlich.

Die Subtilisine 147 und 309 werden unter den Handelsnamen Esperase[®], beziehungsweise Savinase[®] von der Firma Novozymes vertrieben. Sie stammen ursprünglich aus *Bacillus*-Stämmen, die mit der Anmeldung GB 1243784 offenbart werden.

Das Subtilisin DY ist ursprünglich von Nedkov *et al.* 1985 in *Biol. Chem Hoppe-Seyler*, Band 366, S. 421-430 beschrieben worden.

Weitere Proteasen vom Subtilisin-Typ, die aus *Bacillus*-Stämmen isoliert worden sind, werden in den jüngeren Patentanmeldungen WO03/054185 und WO03/054184 sowie in der noch nicht veröffentlichten Patentanmeldung DE102006022216 beschrieben.

Eine Strategie, um die Waschleistung der Subtilisine zu verbessern, besteht darin, statistisch oder gezielt in den bekannten Molekülen einzelne Aminosäuren gegen andere zu substituieren und die erhaltenen Varianten auf ihre Beiträge zur Waschleistung zu überprüfen. Die Enzyme können mit bestimmten Aminosäureaustauschen oder Deletionen auch hinsichtlich ihrer Allergenizität verbessert werden.

Um die Waschleistung der Subtilisine zu verbessern, wurde in zahlreichen Anmeldungen die Strategie der Insertion zusätzlicher Aminosäuren in die aktiven Loops verfolgt. Diese Strategie sollte prinzipiell auf alle Subtilisine anwendbar sein, die einer der Untergruppen I-S1 (wahre Subtilisine) oder I-S2 (hochalkalische Subtilisine) angehören.

Eine andere Strategie der Leistungsverbesserung besteht darin, die Oberflächenladungen und/oder den isoelektrischen Punkt der Moleküle und darüber ihre Wechselwirkungen mit dem Substrat zu verändern. Ferner wurden Punktmutanten mit verringerter pH-Wert-abhängiger Molekülladungsvariation beschrieben. Aus diesem Prinzip wurde auch ein Verfahren zur Identifizierung von Varianten abgeleitet, die für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln geeignet sein sollen; dabei weisen alle offenbarten Varianten mindestens einen Austausch in Position 103 auf. Generell werden in der Literatur sehr häufig Varianten mit einem Austausch an Position 103 beschrieben, gegebenenfalls kombiniert mit einer Vielzahl anderer möglicher Austausche. Eine alternative Möglichkeit zur Leistungsverbesserung in Wasch- und Reinigungsmitteln besteht darin, die Hydrophobizität der Moleküle zu erhöhen, was einen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms haben kann.

Eine andere Methode, die Leistungsfähigkeit von Proteasen zu modulieren, besteht in der Bildung von Fusionsproteinen. So werden in der Literatur beispielsweise Fusionsproteine aus Proteasen und einem Inhibitor wie dem Streptomyces-Subtilisin-Inhibitor offenbart. Eine andere Möglichkeit ist beispielsweise die Kopplung an die von Cellulasen abgeleitete Cellulosebindungsdomäne (CBD) zur Erhöhung der Konzentration an aktivem Enzym in unmittelbarer Nähe zum Substrat oder die Kopplung eines Peptidlinkers und daran von Polymeren, um die Allergenizität beziehungsweise Immunogenizität herabzusetzen.

Methoden zum Erzeugen von statistischen Aminosäureaustauschen können beispielsweise auf dem Phage Display beruhen. Eine moderne Richtung der Enzymentwicklung besteht darin, Elemente aus bekannten, miteinander verwandten Proteinen über statistische Verfahren zu neuen Enzymen zu kombinieren, die bislang nicht erreichte Eigenschaften aufweisen. Solche Verfahren werden auch unter dem Oberbegriff Rekombination zusammengefasst. Dazu gehören beispielsweise folgende Verfahren: Die StEP-Methode (Zhao et al. (1998), *Nat. Biotechnol.*, Band 16, S. 258-261), Random priming recombination (Shao et al., (1998), *Nucleic Acids Res.*, Band 26, S. 681-683), DNA-Shuffling (Stemmer, W.P.C. (1994), *Nature*, Band 370, S. 389-391) oder Recursive sequence recombination (RSR; WO 98/27230, WO 97/20078, WO 95/22625) oder die Methode RACHITT (Coco, W.M. et al. (2001), *Nat. Biotechnol.*, Band 19, S. 354-359). Einen Überblick über derartige Methoden vermittelt auch der Aufsatz "Gerichtete Evolution und Biokatalyse" von Powell et al. (2001), *Angew. Chem.*, Band 113, S. 4068-4080.

Eine weitere, insbesondere ergänzende Strategie besteht darin, die Stabilität der betreffenden Proteasen zu erhöhen und damit ihre Wirksamkeit zu erhöhen. Eine Stabilisierung über Kopplung an ein Polymer ist etwa für Proteasen beschrieben worden, die in Kosmetika eingesetzt werden; hierdurch konnte eine bessere Hautverträglichkeit erreicht werden. Insbesondere für Wasch- und Reinigungsmittel sind dagegen Stabilisierungen durch Punktmutationen geläufiger. So können Proteasen etwa dadurch stabilisiert werden, insbesondere auch hinsichtlich des Einsatzes bei höheren Temperaturen, dass man bestimmte Tyrosin-Reste gegen andere austauscht. Andere beschriebene Möglichkeiten zur Stabilisierung über Punktmutagenese sind beispielsweise:

- Austausch bestimmter Aminosäurereste gegen Prolin;
- Einführung polarerer oder geladenerer Gruppen auf der Oberfläche des Moleküls;
- Verstärkung der Bindung von Metallionen, insbesondere über Mutagenese der Calcium-Bindungsstellen;
- Blockade der Autolyse durch Modifikation oder Mutagenese;
- Ermittlung der zur Stabilisierung relevanten Positionen über eine Analyse der dreidimensionalen Struktur.

Es ist bekannt, dass Proteasen zur Verbesserung der Wasch- beziehungsweise Reinigungsleistung zusammen mit α -Amylasen und weiteren Waschmittelenzymen, insbesondere Lipasen, eingesetzt

werden können. Ebenso ist der Einsatz von Proteasen in Waschmitteln in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie etwa Bleichmitteln oder Soil-Release-Wirkstoffen dem Fachmann bekannt.

Es ist ferner bekannt, dass einige für den Einsatz in Waschmitteln etablierte Proteasen auch für kosmetische Zwecke oder für die organisch-chemische Synthese geeignet sind.

Die hier beispielhaft dargestellten, diversen technischen Einsatzgebiete erfordern Proteasen mit unterschiedlichen Eigenschaften, was beispielsweise die Reaktionsbedingungen, die Stabilität oder die Substratspezifität angeht. Umgekehrt hängen die technischen Einsatzmöglichkeiten der Proteasen, beispielsweise im Kontext einer Wasch- oder Reinigungsmittelrezeptur, von weiteren Faktoren wie Stabilität des Enzyms gegenüber hohen Temperaturen, gegenüber oxidierenden Agentien, dessen Denaturierung durch Tenside, von Faltungseffekten oder von erwünschten Synergien mit anderen Inhaltsstoffen ab.

Somit besteht nach wie vor ein hoher Bedarf an technisch einsetzbaren Proteasen, die aufgrund der Vielzahl ihrer Einsatzgebiete in ihrer Gesamtheit ein breites Spektrum an Eigenschaften bis hin zu sehr subtilen Leistungsunterschieden abdecken.

Die Basis hierfür wird durch neue Proteasen erweitert, welche ihrerseits hinsichtlich spezieller Einsatzgebiete gezielt weiterentwickelt werden können.

Der vorliegenden Erfindung lag also die Aufgabe zugrunde, eine weitere, noch nicht bekannte Protease aufzufinden. Das Wildtyp-Enzym sollte sich vorzugsweise dadurch auszeichnen, dass es bei Verwendung in einem entsprechenden Mittel den für diesen Zweck etablierten Enzymen zumindest nahekommt. Hierbei war insbesondere der Beitrag zur Leistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels von Interesse.

Weitere Aufgaben der vorliegenden Erfindung können darin gesehen werden, Proteasen, insbesondere vom Subtilisin-Typ, bereitzustellen, die gegenüber dem Stand der Technik eine verbesserte Stabilität gegenüber Temperatureinflüssen, pH-Wert-Schwankungen, denaturierenden oder oxidierenden Agentien, proteolytischem Abbau, hohen Temperaturen, sauren oder alkalischen Bedingungen oder gegenüber einer Veränderung der Redox-Verhältnisse aufweisen. Weitere Aufgaben können in einer verringerten Immunogenität bzw. verringerten allergenen Wirkung gesehen werden.

Weitere besondere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Proteasen ausfindig zu machen, die bei Temperaturen von 20 bis 60 °C eine gute Waschleistung, vorzugsweise eine verbesserte Waschleistung im Vergleich zu den im Stand der Technik offenbarten Proteasen, insbesondere denjenigen vom Subtilisin-Typ, aufweisen.

Eine weitere besondere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Proteasen ausfindig zu machen, die in Bezug auf die im Stand der Technik bekannten homologen Proteasen eine verbesserte Waschleistung in Bezug auf zumindest eine Anschmutzung, vorzugsweise in Bezug auf mehrere Anschmutzungen, aufweisen.

Weitere Teilaufgaben bestanden darin, Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die für derartige Proteasen kodieren, und Vektoren, Wirtszellen und Herstellverfahren zur Verfügung zu stellen, die zur Gewinnung derartiger Proteasen genutzt werden können. Ferner sollten entsprechende Mittel, insbesondere Wasch- und Reinigungsmittel, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren sowie entsprechende Verwendungsmöglichkeiten für derartige Proteasen zur Verfügung gestellt werden. Schließlich sollten technische Einsatzmöglichkeiten für die gefundenen Proteasen definiert werden.

Die Lösung der Aufgabe besteht in Alkalischen Proteasen vom Subtilisin-Typ mit Aminosäuresequenzen, die zu der im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 2 von Position 115 bis 383 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 97,5 % identisch sind und/oder in Bezug zu dieser Aminosäuresequenz höchstens in 6 Aminosäurepositionen abweichen.

Zunehmend bevorzugt sind jeweils solche mit einem zunehmenden Maß an Identität mit der neuen Alkalischen Protease aus *Bacillus gibsonii*, also solche, die nur in 5, 4, 3 oder 2 Aminosäurepositionen, vorzugsweise nur in einer Aminosäureposition abweichen, und ganz besonders bevorzugt ist die Alkalische Protease aus *Bacillus gibsonii* selbst.

Weitere Lösungen der Aufgabe, beziehungsweise Lösungen der Teilaufgaben und somit jeweils eigene Erfindungsgegenstände bestehen in Nukleinsäuren, deren Sequenzen zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleotidsequenz hinreichend sind und/oder für erfindungsgemäße Proteasen codieren, in entsprechenden Vektoren, Zellen beziehungsweise Wirtszellen und Herstellverfahren. Ferner werden entsprechende Mittel, insbesondere Wasch- und Reinigungsmittel, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren sowie entsprechende Verwendungsmöglichkeiten für derartige Proteasen zur Verfügung gestellt. Schließlich werden technische Einsatzmöglichkeiten für die gefundenen Proteasen definiert.

Als nächstliegender Stand der Technik sind die Offenlegungsschriften WO03/054185 und WO03/054184 sowie die noch unveröffentlichte Patentanmeldung DE 102006022216 anzusehen, in denen die Verwendung sehr stark homologer Enzyme in Wasch- und Reinigungsmitteln beschrieben wird.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende, natürlicherweise gebildete Alkalische Protease vom Subtilisin-Typ ist, wie anhand der Beispiele nachvollzogen werden kann, aus dem Kulturüberstand eines neuen *Bacillus gibsonii*-Stammes erhältlich, der von der DSMZ (Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als solcher identifiziert worden ist. Eine Hinterlegung dieses Stammes erfolgte nicht. Stattdessen wurde zum Zwecke der Nacharbeitbarkeit gemäß Budapester Vertrag ein Plasmid, das die Nukleinsäuresequenz des erfindungsgemäßen Enzyms enthält, bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) mit der Hinterlegungsnummer DSM 18912 hinterlegt.

Die vorliegende Patentanmeldung verfolgte die Strategie, aus einem natürlichen Habitat einen Protease-bildenden Mikroorganismus und somit ein natürlicherweise gebildetes Enzym aufzufinden, das die gestellten Anforderungen möglichst vollständig erfüllt.

Solch ein Enzym konnte, wie in den Beispielen der vorliegenden Anmeldung beschrieben ist, mit der Alkalischen Protease aus *Bacillus gibsonii* gefunden werden.

Die Nukleotidsequenz der erfindungsgemäßen neuen Alkalischen Protease aus *Bacillus gibsonii* ist im Sequenzprotokoll der vorliegenden Anmeldung unter SEQ ID NO. 1 angegeben. Sie umfasst 1152 bp. Die hiervon abgeleitete Aminosäuresequenz wird in SEQ ID NO. 2 angegeben. Sie umfasst 383 Aminosäuren, gefolgt von einem Stopp-Codon. Hiervon sind die ersten 114 Aminosäuren wahrscheinlich nicht im maturen Protein enthalten, so dass sich für das mature Protein voraussichtlich eine Länge von 269 Aminosäuren ergibt.

Diese Sequenzen wurden mit den aus allgemein zugänglichen Datenbanken Swiss-Prot (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Genf, Schweiz; <http://www.genebio.com/sprot.html>) und GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) erhältlichen Proteasesequenzen verglichen, um die Proteine mit der größten Homologie zu ermitteln.

Das Maß für die Homologie ist ein Prozentsatz an Identität, wie er beispielsweise nach der von D. J. Lipman und W. R. Pearson in *Science* 227 (1985), S. 1435-1441 angegebenen Methode bestimmt werden kann. Diese Angabe kann sich auf das gesamte Protein oder auf den jeweils zuzuordnenden Bereich beziehen. Ein weiter gefasster Homologie-Begriff, die Ähnlichkeit, bezieht auch konservierte Variationen, also Aminosäuren mit ähnlicher chemischer Aktivität in die Betrachtung mit ein, da diese innerhalb des Proteins meist ähnliche chemische Aktivitäten ausüben. Bei Nukleinsäuren kennt man nur den Prozentsatz an Identität.

Auf der Ebene der DNA wurden für das gesamte Gen folgende drei Gene als nächstähnliche identifiziert: (1.) Subtilisin HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE 102006022216) mit 88% Identität, (2.) Subtilisin TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184) mit 88% Identität, (3.) Subtilisin TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185) mit 86% Identität.

Auf der Ebene der für das mature Protein kodierenden DNA wurden die folgenden drei Gene als die nächstähnlichen identifiziert: (1.) Subtilisin HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE 102006022216) mit 87% Identität, (2.) Subtilisin TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184) mit 86% Identität, (3.) Subtilisin TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185) mit 84% Identität.

Auf der Ebene der für das Propeptid kodierenden DNA wurden die folgenden drei Gene als die nächstähnlichen identifiziert: (1.) TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185) mit 92% Identität, (2.) TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184) mit 91% Identität, (3.) HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE 102006022216) mit 89% Identität.

Auf der Ebene der für das Signalpeptid kodierenden DNA wurden die folgenden drei Gene als die nächstähnlichen identifiziert: (1.) TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185) mit 98% Identität, (2.) HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE 102006022216) mit 95% Identität, (3.) TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184) mit 94% Identität.

Auf der Ebene der Aminosäuren des gesamten Präproproteins wurden als nächstähnliche identifiziert: (1.) Subtilisin HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE 102006022216) mit 96% Identität, (2.) Subtilisin TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184) mit 95% Identität, (3.) Subtilisin TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185) mit 92% Identität.

Auf der Ebene der Aminosäuren des maturen Proteins wurden als nächstähnliche identifiziert: (1.) Subtilisin HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE 102006022216) mit 97% Identität, (2.) Subtilisin TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184) mit 96% Identität, (3.) Subtilisin TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185) mit 91% Identität.

Auf der Ebene der Aminosäuren des Propeptids wurden als nächstähnliche identifiziert: (1.) TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185) mit 93% Identität, (2.) HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE 102006022216) mit 91% Identität, (3.) TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184) mit 90% Identität.

Aufgrund der zu erkennenden Übereinstimmungen und der Verwandtschaft zu den anderen angegebenen Subtilisinen ist diese Alkalische Protease als ein Subtilisin anzusehen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit jedes Polypeptid, insbesondere jede Hydrolase, vor allem jede Alkalische Protease vom Subtilisin-Typ, mit einer Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 96,5% identisch ist und/oder in Bezug zu der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz höchstens in 14 Aminosäurepositionen abweicht.

Zunehmend bevorzugt sind darunter solche Polypeptide, deren Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 97% oder 97,5%, besonders bevorzugt zu mindestens 98% oder 98,5%, vor allem zu mindestens 99% oder 99,5% identisch ist und/oder solche, deren Aminosäuresequenz in Bezug zu der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz höchstens in 13, 12, 11, 10, 9, 8 oder 7, insbesondere höchstens in 6, 5, 4, 3 oder 2 Aminosäurepositionen, besonders bevorzugt höchstens in einer Aminosäureposition abweicht. Ganz besonders bevorzugt ist ein Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2.

Denn es ist zu erwarten, dass deren Eigenschaften denen der erfindungsgemäßen Alkalischen Protease aus *B. gibsonii* zunehmend ähnlich sind.

Wie bereits erwähnt, sind aufgrund eines Vergleichs der N-terminalen Sequenzen vermutlich die Aminosäuren 1 bis 114 als Leaderpeptid anzusehen, wobei die Aminosäuren 1 bis 27 vermutlich das Signalpeptid darstellen, und erstreckt sich das mature Protein voraussichtlich von den Positionen 115 bis 383 gemäß der SEQ ID NO: 2. Die Position 384 wird demnach von einem Stopp-Codon eingenommen, entspricht also eigentlich keiner Aminosäure. Da aber auch die Information über das Ende eines codierenden Bereichs als wichtiger Bestandteil einer Aminosäuresequenz angesehen werden kann, wird diese Position erfindungsgemäß in den Bereich einbezogen, der dem maturen Protein entspricht.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit jedes Polypeptid, insbesondere jede Hydrolase, vor allem jede Alkalische Protease vom Subtilisin-Typ mit einer Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO: 2 von Position 115 bis Position 383 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 97,5% identisch ist und/oder in Bezug zu dieser Aminosäuresequenz höchstens in 6 Aminosäurepositionen abweicht.

Zunehmend bevorzugt sind darunter solche Polypeptide, deren Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID NO: 2 von Position 115 bis Position 383 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu jeweils 98% oder 98,5%, besonders bevorzugt mindestens zu 99% oder 99,5% identisch ist und/oder solche, deren Aminosäuresequenz in Bezug zu der in SEQ ID NO: 2 von Position 115 bis 383 angegebenen Aminosäuresequenz höchstens in 5 oder 4, insbesondere höchstens in 3 oder 2 Aminosäurepositionen, besonders bevorzugt höchstens in einer Aminosäureposition abweicht. Ganz besonders bevorzugt ist hierbei ein Protein mit einer Aminosäuresequenz von Position 115 bis 383 gemäß SEQ ID NO: 2.

Sollte sich, beispielsweise durch eine N-terminale Sequenzierung des *in vivo* von *Bacillus gibsonii* freigesetzten proteolytischen Proteins, herausstellen, dass die Spaltstelle nicht zwischen der 114. und der 115. Aminosäure gemäß SEQ ID NO: 2 sondern an einer anderen Stelle liegt, so beziehen sich diese Angaben auf die tatsächliche Spaltstelle bzw. auf das tatsächliche mature Protein.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Fragmente insbesondere des murenen Proteins, sofern diese gegenüber dem Stand der Technik neu sind.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz mit mindestens 81, vorzugsweise mindestens 90, 100 oder 120, besonders bevorzugt mindestens 150, 175 oder 200, vor allem mindestens 225 oder 250, aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, insbesondere der Aminosäuresequenz von Position 115 bis 383 gemäß SEQ ID NO: 2, umfassen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher ebenso Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz mit mindestens 127, vorzugsweise mindestens 140, 160 oder 170, besonders bevorzugt mindestens 180, 190 oder 200, vor allem mindestens 220, 240 oder 250 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, insbesondere der Aminosäuresequenz von Position 115 bis 383 gemäß SEQ ID NO: 2, umfassen oder höchstens in einer Aminosäureposition davon abweichen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher ebenso Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz mit mindestens 171, vorzugsweise mindestens 180, 190 oder 200, besonders bevorzugt mindestens 210, 220 oder 230, vor allem mindestens 240, 250 oder 260 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, insbesondere der Aminosäuresequenz von Position 115 bis 383 gemäß SEQ ID NO: 2, umfassen oder höchstens in zwei Aminosäurepositionen, vorzugsweise höchstens in einer Aminosäureposition, davon abweichen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher ebenso Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz mit mindestens 192, vorzugsweise mindestens 200, 210 oder 220, besonders bevorzugt mindestens 230, 240 oder 250 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, insbesondere der Aminosäuresequenz von Position 115 bis 383 gemäß SEQ ID NO: 2, umfassen oder höchstens in drei, vorzugsweise höchstens in zwei, besonders bevorzugt höchstens in einer Position, davon abweichen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher ebenso Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz von Position 164 bis Position 382 der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Sequenz umfassen oder aber höchstens in sechs oder fünf, vorzugsweise höchstens in vier oder drei, besonders bevorzugt höchstens in zwei Positionen, vor allem höchstens in einer Position, davon abweichen.

Da auch das Signalpeptid und das Propeptid Einheiten darstellen, die als solche von erfindungsgemäßem Interesse sind, sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung

solche Peptide, die zu diesen Polypeptiden homolog sind, sofern sie neu sind. Wie gesagt handelt es sich voraussichtlich bei den Aminosäuren 1 bis 114 um das Leaderpeptid, wobei die Aminosäuren 1 bis 27 vermutlich das Signalpeptid und entsprechend die Aminosäuren 28 bis 114 das Propeptid darstellen. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Polypeptide mit einer Aminosäuresequenz von Position 1 bis 114 sowie von Position 28 bis 114 gemäß SEQ ID NO: 2 sowie Polypeptide, die ausgehend von diesen Aminosäuresequenzen in höchstens 4, vorzugsweise in höchstens 3 oder 2 Aminosäurepositionen, vor allem in genau einer Aminosäureposition abweichen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen, weiter unten genannten Polynukleotiden kodiert werden.

Zunehmend bevorzugt sind darunter solche Polypeptide, die sich von einer Nukleotidsequenz ableiten, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleotidsequenz möglichst ähnlich ist, insbesondere über den Teilbereich, der den Positionen 115 bis 384 des Polypeptids gemäß SEQ ID NO. 2 entspricht.

Denn es ist zu erwarten, dass diese Nukleinsäuren für Proteine kodieren, deren Eigenschaften denen der erfindungsgemäßen Alkalischen Protease aus *Bacillus gibsonii*, insbesondere dem maturen Protein zunehmend ähnlich sind. Auch hier, wie für alle nachfolgenden Ausführungsformen gilt wiederum, dass sich diese Angaben auf das tatsächliche mature Protein beziehen, falls sich herausstellen sollte, dass die Spaltstelle des Proteins an einer anderen Stelle als oben angegeben liegt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind angesichts des nächstliegenden Standes der Technik, nämlich angesichts der Proteasen Subtilisin HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE 102006022216), Subtilisin TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184) und Subtilisin TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185) bevorzugt solche erfindungsgemäßen Polypeptide, die gegenüber diesem nächstliegenden Stand der Technik eine verbesserte Waschleistung in Bezug auf mindestens eine Anschmutzung, vorzugsweise in Bezug auf mindestens zwei Anschmutzungen, insbesondere ausgewählt aus Gras auf Baumwolle, Milch/Öl auf Baumwolle, Ganzei/Ruß auf Baumwolle, Schokomilch/Ruß auf Baumwolle und Blut/Milch auf Baumwolle, insbesondere bei einer Washtemperatur von 20 bis 60°C, bevorzugt 30°C, und bevorzugt bei Einsatz in einem Flüssigwaschmittel aufweisen. Ganz besonders bevorzugt liegt hierbei eine verbesserte Waschleistung bei 30°C bei Einsatz in einem Flüssigwaschmittel in Bezug auf alle der zuvor genannten Anschmutzungen vor.

Die erfindungsgemäß am meisten bevorzugte Ausführungsform ist jede Alkalische Protease vom Subtilisin-Typ, deren Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz insgesamt, vorzugsweise in den Positionen 115 bis 383 identisch ist und/oder

deren Aminosäuresequenz von der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleotidsequenz, vorzugsweise von den Positionen 343 bis 1152, abgeleitet werden kann.

Denn um eine solche handelt es sich bei der neu gefundenen und mit der vorliegenden Anmeldung zur Verfügung gestellten Alkalische Protease aus *Bacillus gibsonii*.

Diese ist eine im Stand der Technik noch nicht bekannte Protease. Sie ist, wie in den Beispielen angegeben, isolierbar, herstellbar und einsetzbar. Sie zeichnet sich, wie ebenfalls in den Beispielen dokumentiert, zusätzlich dadurch aus, dass sie bei Verwendung in einem entsprechenden Mittel den für diesen Zweck etablierten Enzymen in der Leistung zumindest nahekommmt, beziehungsweise sie sogar übertrifft.

Bei den erfindungsgemäßen Polypeptiden handelt es sich vorzugsweise um Enzyme, besonders bevorzugt um Hydrolasen, insbesondere um Proteasen, besonders bevorzugt um Endo-Peptidasen, vor allem um Proteasen vom Subtilisin-Typ, oder um Teile davon. Die erfindungsgemäßen Polypeptide sind daher vorzugsweise dazu in der Lage, Säureamidbindungen von Proteinen zu hydrolysieren, insbesondere solche die im Inneren der Proteine liegen. Bei den Teilen der Polypeptide kann es sich insbesondere um Protein-Domänen handeln, die etwa zur Bildung funktionsfähiger chimärer Enzyme geeignet sein können.

Für die Entwicklung von technischen, insbesondere in Waschmitteln einsetzbaren Proteasen kann sie als ein natürlicherweise, mikrobiell gebildetes Enzym als Ausgangspunkt dienen, um über an sich bekannte Mutagenese-Verfahren, beispielsweise Punktmutagenese, Fragmentierung, Deletion, Insertion oder Fusion mit anderen Proteinen oder Proteinteilen oder über sonstige Modifikationen für den gewünschten Einsatz optimiert zu werden. Derartige Optimierungen können beispielsweise Anpassungen an Temperatur-Einflüsse, pH-Wert-Schwankungen, Redox-Verhältnissen und/oder sonstigen Einflüsse, sein, die für die technischen Einsatzgebiete relevant sind. Gewünscht sind beispielsweise eine Verbesserung der Oxidationsbeständigkeit, der Stabilität gegenüber denaturierenden Agentien oder proteolytischem Abbau, gegenüber hohen Temperaturen, sauren oder stark alkalischen Bedingungen, eine Veränderung der Sensitivität gegenüber Calciumionen oder anderen Cofaktoren, eine Senkung der Immunogenität oder der allergenen Wirkung.

Hierfür können beispielsweise durch gezielte Punktmutationen die Oberflächenladungen oder die an der Katalyse oder Substratbindungen beteiligten Loops geändert werden. Ein Ausgangspunkt hierfür ist ein Alignment mit bekannten Proteasen. Dieses ermöglicht, Positionen ausfindig zu machen, durch deren Veränderung gegebenenfalls eine Verbesserung der Eigenschaften des Proteins erreicht werden könnte.

Die Mutagenese-Verfahren beruhen auf der zugehörigen Nukleotidsequenz, die in SEQ ID NO. 1 angegeben ist, beziehungsweise den hierzu hinreichend ähnlichen Nukleotidsequenzen, die weiter

unten als eigener Erfindungsgegenstand dargestellt werden. Entsprechende molekularbiologische Methoden sind im Stand der Technik beschrieben, so beispielsweise in Handbüchern wie dem von Fritsch, Sambrook und Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York, 1989.

Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind daher neben den bereits zuvor als erfindungsgemäß genannten auf Punkt- bzw. Substitutionsmutation beruhenden Proteinvarianten auch alle von den zuvor genannten erfindungsgemäßen Polypeptiden, insbesondere von Polypeptiden mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 bzw. von Position 115 bis Position 383 gemäß SEQ ID NO: 2, durch Insertionsmutagenese und/oder Substitutionsmutagenese und/oder Inversionsmutagenese und/oder durch Fusion mit mindestens einem anderen Protein oder Proteinfragment abgeleiteten Polypeptide, insbesondere solche Polypeptide mit Insertionen und/oder Deletionen und/oder Inversionen von bis zu 50 Aminosäuren, besonders bevorzugt von bis zu 40, 30 oder 20, insbesondere von bis zu 15, 10 oder 5, vor allem von bis zu 4, 3 oder 2 Aminosäuren, vor allem mit Deletionen und/oder Insertionen von genau einer Aminosäure.

So ist es beispielsweise möglich, an den Termini oder in den Loops des Enzyms einzelne Aminosäuren zu deletieren, ohne dass dadurch die proteolytische Aktivität verloren geht. Solche Mutationen werden beispielsweise in WO 99/49057 A1 beschrieben. WO 01/07575 A2 lehrt, dass durch derartige Deletionen die Allergenizität betreffender Proteasen gesenkt und somit insgesamt ihre Einsetzbarkeit verbessert werden kann. Die Fragmentierung kommt dem später ausgeführten Aspekt der Insertions- oder Substitutionsmutagenese und/oder Fusion mit anderen Enzymen zugute. Hinsichtlich des beabsichtigten Einsatzes dieser Enzyme ist es besonders bevorzugt, wenn sie auch nach der Fragmentierung oder Deletionsmutagenese eine proteolytische Aktivität besitzen.

Zahlreiche Dokumente des Stands der Technik offenbaren auch vorteilhafte Wirkungen von Insertionen und Substitutionen in Subtilasen; darunter auch die Publikationen WO 99/49057 und WO 01/07575. Prinzipiell gehören hierzu neben der Substitution einzelner Aminosäuren auch die Substitution mehrerer zusammenhängender Aminosäuren. Hierzu gehören auch Neukombinationen von größeren Enzymabschnitten, so den oben genannten Fragmenten, mit anderen Proteasen oder Proteinen anderer Funktion. So ist es beispielsweise in Anlehnung an WO 99/57254 möglich, ein erfindungsgemäßes Protein oder Teile davon über peptidische Linker oder direkt als Fusionsprotein mit Bindungsdomänen aus anderen Proteinen, etwa der Cellulose-Bindungsdomäne, zu versehen und dadurch die Hydrolyse des Substrats effektiver zu gestalten. Ebenso können erfindungsgemäße Proteine beispielsweise auch mit Amylasen oder Cellulasen verknüpft werden, um eine Doppelfunktion auszuüben.

Unter den erfindungsgemäßen Polypeptiden sind solche Proteinvarianten bevorzugt, die einen oder mehrere Aminosäureaustausche in den Positionen 3, 4, 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102,

104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 und 268 in der Zählung der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* aufweisen.

Erfindungsgemäße chimäre Proteine weisen im weitesten Sinne eine proteolytische Aktivität auf. Diese kann von einem Molekülteil ausgeübt oder modifiziert werden, das sich von einem erfindungsgemäßen Polypeptid herleitet. Die chimären Proteine können über ihre Gesamtlänge hinweg somit auch außerhalb des oben beanspruchten Bereichs liegen. Der Sinn einer solchen Fusion besteht beispielsweise darin, mithilfe des heranfusionsierten erfindungsgemäßen Proteinteils eine bestimmte Funktion oder Teilfunktion einzuführen oder zu modifizieren. Es ist dabei im Sinne der vorliegenden Erfindung unwesentlich, ob solch ein chimäres Protein aus einer einzelnen Polypeptidkette oder mehreren Untereinheiten besteht. Zur Realisierung der letztgenannten Alternative ist es beispielsweise möglich, posttranslational oder erst nach einem Aufreinigungsschritt durch eine gezielte proteolytische Spaltung eine einzelne chimäre Polypeptidkette in mehrere zu zerlegen.

So ist es beispielsweise in Anlehnung an WO 99/57254 möglich, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Teile davon über peptidische Linker oder direkt als Fusionsprotein mit Bindungsdomänen aus anderen Proteinen, etwa der Cellulose-Bindungsdomäne, zu versehen und dadurch die Hydrolyse des Substrats effektiver zu gestalten. Solch eine Bindungsdomäne könnte auch aus einer Protease stammen, etwa um die Bindung des erfindungsgemäßen Proteins an ein Protease-Substrat zu verstärken. Dies erhöht die lokale Protease-Konzentration, was in einzelnen Anwendungen, beispielsweise in der Behandlung von Rohstoffen vorteilhaft sein kann. Ebenso können erfindungsgemäße Proteine beispielsweise auch mit Amylasen oder Cellulasen verknüpft werden, um eine Doppelfunktion auszuüben.

Die durch Insertionsmutation erhältlichen erfindungsgemäßen Polypeptide sind ihrer prinzipiellen Gleichartigkeit wegen den erfindungsgemäßen chimären Proteinen zuzuordnen. Hierher gehören auch Substitutionsvarianten, also solche, bei denen einzelne Bereiche des Moleküls gegen Elemente aus anderen Proteinen ersetzt worden sind.

Der Sinn von Insertions- und Substitutionsmutagenese besteht wie bei der Hybridbildung darin, einzelne Eigenschaften, Funktionen oder Teilfunktionen erfindungsgemäßer Proteine mit denen anderer Proteine zu kombinieren. Hierzu gehört beispielsweise auch über ein Shuffling oder Neukombination von Teilsequenzen aus verschiedenen Proteasen zu erhaltende Varianten. Dadurch können Proteine erhalten werden, die zuvor noch nicht beschrieben worden sind. Solche Techniken erlauben drastische Effekte bis hin zu sehr subtilen Aktivitätsmodulationen.

Vorzugsweise werden solche Mutationen nach einem statistischen, dem Bereich Directed Evolution zuzuordnenden Verfahren, wie beispielsweise nach der StEP-Methode (Zhao et al. (1998), *Nat. Biotechnol.*, Band 16, S. 258-261), der Random priming recombination (Shao et al., (1998), *Nucleic*

Acids Res., Band 26, S. 681-683), dem DNA-Shuffling (Stemmer, W.P.C. (1994), *Nature*, Band 370, S. 389-391) oder Recursive sequence recombination (RSR; WO 98/27230, WO 97/20078, WO 95/22625) oder der Methode RACHITT (Coco, W.M. et al. (2001), *Nat. Biotechnol.*, Band 19, S. 354-359) durchgeführt. Zweckmäßigerweise sind derartige Verfahren mit einem auf die Mutagenese und Expression folgenden Selektions- oder Screening-Verfahren gekoppelt, um Varianten mit den gewünschten Eigenschaften zu erkennen. Da diese Techniken auf der DNA-Ebene ansetzen, steht mit den jeweils zugehörigen neu erzeugten Genen der Ausgangspunkt für die biotechnologische Produktion zur Verfügung.

Inversionsmutagenese, also eine partielle Sequenzumkehrung, kann als Sonderform sowohl der Deletion, als auch der Insertion angesehen werden. Solche Varianten können ebenfalls zielgerichtet oder zufallsgemäß erzeugt werden.

Bevorzugt sind all solche bislang ausgeführten erfindungsgemäßen Polypeptiden, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie an sich Protein zu hydrolysieren vermögen.

Solche werden nach der offiziellen *Enzyme Nomenclature 1992* der IUBMB unter 3.4 (Peptidasen) zusammengefaßt. Hierunter sind Endopeptidasen, besonders der Gruppen 3.4.21 Serin-Proteinasen, 3.4.22 Cystein-Proteinasen, 3.4.23 Aspartat-Proteinasen und 3.4.24 Metallo-Proteinasen bevorzugt. Unter diesen sind Serin-Proteinasen (3.4.21) besonders bevorzugt, hierunter Subtilasen und hierunter ganz besonders Subtilisine (vergleiche "Subtilases: Subtilisin-like Proteases" von R. Siezen, Seite 75-95 in "Subtilisin enzymes", herausgegeben von R. Bott und C. Betzel, New York, 1996). Hierunter sind wiederum die Subtilisine der Gruppe IS-2, der hochalkalischen Subtilisine, bevorzugt.

Hierbei sind aktive Moleküle inaktiven gegenüber bevorzugt, da beispielsweise in den unten ausgeführten Einsatzgebieten insbesondere die ausgeübte Proteolyse von Bedeutung ist.

Auch die oben ausgeführten Fragmente besitzen im weitesten Sinne eine proteolytische Aktivität, etwa zur Komplexierung eines Substrats oder zur Ausbildung eines für die Hydrolyse erforderlichen Strukturelements. Bevorzugt sind sie, wenn sie für sich betrachtet bereits zur Hydrolyse eines anderen Proteins eingesetzt werden können, ohne dass weitere Protease-Komponenten anwesend sein müssen. Dies betrifft die Aktivität, die von einer Protease an sich ausgeübt werden kann; die möglicherweise gleichzeitig notwendige Anwesenheit von Puffersubstanzen, Cofaktoren etc. bleibt hiervon unberührt.

Ein Zusammenspiel unterschiedlicher Molekülteile zur Hydrolyse von Proteinen besteht in Deletionsmutanten naturgemäß eher als in Fragmenten und ergibt sich insbesondere in Fusionsproteinen, ganz besonders solchen, die aus einem Shuffling verwandter Proteine hervorgegangen sind. Sofern dadurch eine im weitesten Sinne proteolytische Funktion

aufrechterhalten, modifiziert, spezifiziert oder auch erst erreicht wird, handelt es sich bei den Deletionsvarianten wie bei den Fusionsproteinen um erfindungsgemäße Proteine. Bevorzugte Vertreter dieses Erfindungsgegenstands sind darunter die, die an sich dazu in der Lage sind, ein Protein-Substrat zu hydrolysieren, ohne dass weitere Protease-Komponenten anwesend sein müssen.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen all solche bislang ausgeführten erfindungsgemäßen Polypeptide dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie zusätzlich stabilisiert sind.

Dadurch wird ihre Stabilität bei der Lagerung und/oder während ihres Einsatzes, beispielsweise beim Waschprozess erhöht, so dass ihre Aktivität länger anhält und damit verstärkt wird. Die Stabilität erfindungsgemäßer Proteasen kann beispielsweise durch Kopplung an Polymere erhöht werden. Sie erfordert, dass die Proteine vor ihrem Einsatz in entsprechenden Mitteln über einen chemischen Kopplungsschritt mit derartigen Polymeren verbunden werden.

Bevorzugt sind Stabilisierungen, die über Punktmutagenese des Moleküls selbst möglich sind. Denn diese erfordern im Anschluss an die Proteingewinnung keine weiteren Arbeitsschritte. Einige hierfür geeigneten Punktmutationen sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt. So können Proteasen etwa dadurch stabilisiert werden, dass man bestimmte Tyrosin-Reste gegen andere austauscht.

Andere Möglichkeiten sind beispielsweise:

- Der Austausch bestimmter Aminosäurereste gegen Prolin;
- die Einführung polarerer oder geladener Gruppen auf der Oberfläche des Moleküls;
- Veränderung der Bindung von Metallionen, insbesondere der Calcium-Bindungsstellen.
- Gemäß des Patents US 5453372 können Proteine durch bestimmte Mutationen auf der Oberfläche gegen den Einfluß von denaturierenden Agentien wie Tensiden geschützt werden.

Eine andere Möglichkeit zur Stabilisierung gegenüber erhöhter Temperatur und dem Einwirken von Tensiden wäre die Stabilisierung über den Austausch von Aminosäuren, die nahe dem N-Terminus liegen, gegen solche, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Rest des Moleküls in Kontakt treten und somit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der globulären Struktur leisten.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen all solche bislang ausgeführten erfindungsgemäßen Polypeptide dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie zusätzlich derivatisiert sind.

Unter Derivaten werden solche Proteine verstanden, die sich über eine zusätzliche Modifikation von den ausgeführten Proteinen ableiten. Derartige Modifikationen können beispielsweise die Stabilität, Substratspezifität oder die Bindungsstärke an das Substrat oder die enzymatische Aktivität

beeinflussen. Sie können auch dazu dienen, um die Allergenizität und/oder Immunogenizität des Proteins herabzusetzen und damit beispielsweise dessen Hautverträglichkeit zu erhöhen.

Solche Derivatisierungen können beispielsweise biologisch erfolgen, etwa im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese durch den produzierenden Wirtsorganismus. Hier sind Kopplungen niedrigmolekularer Verbindungen wie von Lipiden oder Oligosacchariden besonders hervorzuheben.

Derivatisierungen können aber auch chemisch durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette oder durch kovalente Bindung einer anderen, beispielsweise makromolekularen Verbindung an das Protein. Beispielsweise kann so eine Kopplung von Aminen an Carboxylgruppen des Enzyms zur Veränderung des isoelektrischen Punkts erfolgen. Es können ferner etwa Makromoleküle wie Proteine, etwa über bifunktionelle chemische Verbindungen, an erfindungsgemäße Proteine gebunden werden. Bei einem solchen Makromolekül kann es sich etwa um eine Bindungsdomäne handeln. Solche Derivate eignen sich besonders für den Einsatz in Wasch- oder Reinigungsmitteln. Analog können auch Protease-Inhibitoren über Linker, insbesondere Aminosäure-Linker an die erfindungsgemäßen Proteine gebunden werden. Kopplungen mit sonstigen makromolekularen Verbindungen, wie etwa Polyethylenglykol verbessern das Molekül hinsichtlich weiterer Eigenschaften wie Stabilität oder Hautverträglichkeit.

Unter Derivaten erfindungsgemäßer Proteine können im weitesten Sinne auch Präparationen dieser Enzyme verstanden werden. Je nach Gewinnung, Aufarbeitung oder Präparation kann ein Protein mit diversen anderen Stoffen vergesellschaftet sein, beispielsweise aus der Kultur der produzierenden Mikroorganismen. Ein Protein kann auch, beispielsweise zur Erhöhung seiner Lagerstabilität, mit bestimmten anderen Stoffen gezielt versetzt worden sein. Erfindungsgemäß sind deshalb auch alle Präparationen eines erfindungsgemäßen Proteins. Das ist auch unabhängig davon, ob es in einer bestimmten Präparation tatsächlich diese enzymatische Aktivität entfaltet oder nicht. Denn es kann gewünscht sein, dass es bei der Lagerung keine oder nur geringe Aktivität besitzt, und erst zum Zeitpunkt der Verwendung seine proteolytische Funktion entfaltet. Dies kann beispielsweise über entsprechende Begleitstoffe wie etwa Protease-Inhibitoren gesteuert werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen all diejenigen Proteine, Proteinfragmente, Fusionsproteine oder Derivate dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie wenigstens eine antigene Determinante mit einem der oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Polypeptiden gemeinsam haben.

Denn entscheidend für die enzymatischen Aktivitäten sind die Sekundärstrukturelemente eines Proteins und dessen dreidimensionale Faltung. So können in ihrer Primärstruktur deutlich voneinander abweichende Domänen räumlich weitgehend übereinstimmende Strukturen ausbilden und somit gleiches enzymatisches Verhalten ermöglichen. Solche Gemeinsamkeiten in der Sekundärstruktur werden üblicherweise als übereinstimmende antigene Determinanten von

Antiseren oder reinen oder monoklonalen Antikörpern erkannt. Über immunchemische Kreuzreaktionen können somit einander ähnliche Proteine oder Derivate detektiert und zugeordnet werden. Deshalb werden in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung gerade auch solche Proteine einbezogen, die möglicherweise nicht über ihre Homologiewerte in der Primärstruktur, wohl aber über ihre immunchemische Verwandtschaft den oben definierten erfindungsgemäßen Proteinen, Proteinfragmenten, Fusionsproteinen oder Derivaten zugeordnet werden können.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen all solche bislang ausgeführten erfindungsgemäßen Polypeptide dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie aus einer natürlichen Quelle, insbesondere aus einem Mikroorganismus erhältlich sind.

Dies können beispielsweise einzellige Pilze oder Bakterien sein. Denn sie lassen sich zumeist einfacher gewinnen und handhaben als vielzellige Organismen oder die von Vielzellern abgeleiteten Zellkulturen; obgleich diese für spezielle Ausführungsformen sinnvolle Optionen darstellen können und somit nicht grundsätzlich vom Erfindungsgegenstand ausgeschlossen sind.

Es ist möglich, dass natürlich vorkommende Produzenten zwar ein erfindungsgemäßes Enzym herstellen können, dieses aber unter den zunächst ermittelten Bedingungen nur in geringem Maße exprimieren und/oder in das umgebende Medium abgeben. Das schließt aber nicht aus, dass geeignete Umweltbedingungen oder sonstige Faktoren experimentell ermittelt werden können, unter deren Einwirken sie zu einer wirtschaftlich sinnvollen Produktion des erfindungsgemäßen Proteins angeregt werden können. Solch ein Regulationsmechanismus kann für die biotechnologische Produktion gezielt eingesetzt werden. Sollte auch dies nicht möglich sein, können sie immer noch der Isolierung des zugehörigen Gens dienen.

Besonders bevorzugt sind hierunter solche aus gram-positiven Bakterien. Denn diese besitzen keine äußere Membran und geben sezernierte Proteine somit unmittelbar ins umgebende Medium ab.

Ganz besonders bevorzugt sind solche aus gram-positiven Bakterien der Gattung *Bacillus*.

Bacillus-Proteasen weisen von vornherein günstige Eigenschaften für diverse technische Einsatzmöglichkeiten auf. Dazu gehören eine gewisse Stabilität gegenüber erhöhter Temperatur, oxidierenden oder denaturierenden Agentien. Zudem hat man mit mikrobiellen Proteasen die größten Erfahrungen hinsichtlich ihrer biotechnologischen Produktion, was beispielsweise die Konstruktion günstiger Klonierungsvektoren, die Auswahl von Wirtszellen und Wachstumsbedingungen oder die Abschätzung von Risiken, wie beispielsweise die Allergenizität, angeht. *Bacilli* sind zudem als Produktionsorganismen mit einer besonders hohen Produktionsleistung in technischen Prozessen etabliert. Der Erfahrungsschatz, den man für die Herstellung und den Einsatz dieser Proteasen erworben hat, kommt zudem erfindungsgemäßen Weiterentwicklungen dieser Enzyme zugute. Dies betrifft beispielsweise ihre Kompatibilität mit

anderen chemischen Verbindungen, wie beispielsweise die Inhaltsstoffe von Wasch- oder Reinigungsmitteln.

Unter denen aus den *Bacillus*-Species, wiederum, sind solche aus der Spezies *Bacillus gibsonii*, insbesondere aus dem erfindungsgemäß verwendeten Stamm von *Bacillus gibsonii* bevorzugt.

Denn aus diesem wurde die Ausführungsform des erfindungsgemäßen Enzyms ursprünglich erhalten. Seine zugehörigen Sequenzen sind im Sequenzprotokoll angegeben. Von diesem oder von verwandten Stämmen können die oben beschriebenen Varianten insbesondere unter Anwendung molekularbiologischer Standardmethoden, wie beispielsweise der PCR und/oder an sich bekannten Punktmutagenese-Verfahren hergestellt werden.

Eine weitere Lösung der Aufgabe und somit einen eigenen Erfindungsgegenstand stellen die Nukleinsäuren dar, die der Verwirklichung der Erfindung dienen.

Einem Fachmann ist es über heutzutage allgemein bekannte Methoden, wie beispielsweise die chemische Synthese oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit molekularbiologischen und/oder proteinchemischen Standardmethoden möglich, anhand bekannter DNA- und/oder Aminosäuresequenzen vollständige Gene herzustellen. Derartige Methoden sind beispielsweise aus dem "Lexikon der Biochemie", Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, Band 1, S. 267-271 und Band 2, S. 227-229, bekannt. Dies ist insbesondere dann möglich, wenn auf einen bei einer Stammsammlung hinterlegten Stamm zurückgegriffen werden kann. Beispielsweise mit PCR-Primern, die anhand einer bekannten Sequenz synthetisierbar sind, und/oder über isolierte mRNA-Moleküle können aus solchen Stämmen die betreffenden Gene synthetisiert, kloniert und gewünschtenfalls weiter bearbeitet, beispielsweise mutagenisiert werden.

Nukleinsäuren bilden den Ausgangspunkt nahezu aller molekularbiologischen Untersuchungen und Weiterentwicklungen sowie der Produktion von Proteinen. Dazu gehören insbesondere die Sequenzierung der Gene und die Ableitung der zugehörigen Aminosäure-Sequenz, jede Art von Mutagenese (siehe oben) und die Expression der Proteine.

Mutagenese zur Entwicklung von Proteinen mit bestimmten Eigenschaften wird auch als "Protein Engineering" bezeichnet. Eigenschaften, auf die optimiert wird, sind weiter oben bereits beispielhaft ausgeführt worden. Solch eine Mutagenese kann zielgerichtet oder über zufallsgemäße Methoden, beispielsweise mit einem anschließenden auf die Aktivität gerichteten Erkennungs- und/oder Auswahlverfahren (Screening und Selektion) an den klonierten Genen, etwa über Hybridisierung mit Nukleinsäure-Sonden, oder an den Genprodukten, den Proteinen, etwa über ihre Aktivität durchgeführt werden. Die Weiterentwicklung der erfindungsgemäßen Proteasen kann insbesondere auch an den in der Publikation "Protein engineering" von P.N.Bryan (2000) in *Biochim. Biophys. Acta*, Band 1543, S. 203-222, vorgestellten Überlegungen ausgerichtet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch Polynukleotide, die für erfindungsgemäße Polypeptide, insbesondere Hydrolasen, vor allem alkalische Proteasen vom Subtilisin-Typ, kodieren. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher insbesondere Polynukleotide ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
- b) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 1 bis 342 gemäß SEQ ID NO: 1,
- c) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 1 bis 81 gemäß SEQ ID NO: 1,
- d) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 82 bis 342 gemäß SEQ ID NO: 1,
- e) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 343 bis 1152 gemäß SEQ ID NO: 1,
- f) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2,
- g) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 1 bis 114 gemäß SEQ ID NO: 2,
- h) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 28 bis 114 gemäß SEQ ID NO: 2,
- i) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 115 bis 383 gemäß SEQ ID NO: 2,
- j) Polynukleotid kodierend für ein erfindungsgemäßes Polypeptid,
- k) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten oder polymorphe Formen oder Allele eines Polynukleotids gemäß (a) oder (e) mit bis zu 80, vorzugsweise mit bis zu 75, 70, 65, 60 oder 55, besonders bevorzugt bis zu 50, 45, 40, 35 oder 30, insbesondere bis zu 25, 20, 15 oder 10, vor allem bis zu 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 oder 2 Mutationen, ganz besonders bevorzugt mit genau einer Mutation,
- l) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten oder polymorphe Formen oder Allele eines Polynukleotids gemäß (b) oder (d) mit bis zu 25, vorzugsweise mit bis zu 22, 20, 18, 16 oder 15, besonders bevorzugt bis zu 14, 13, 12, 11 oder 10, vor allem bis zu 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 oder 2 Mutationen, ganz besonders bevorzugt mit genau einer Mutation,
- m) Polynukleotide mit einer Sequenzhomologie oder -identität von mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 91, 92, 93, 94 oder 95 %, besonders bevorzugt mindestens 96, 97, 98 oder 99 %, in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (a) oder (e),
- n) Polynukleotide mit einer Sequenzhomologie oder -identität von mindestens 93 %, vorzugsweise mindestens 94, 95 oder 96 %, besonders bevorzugt mindestens 97, 98 oder 99 %, in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (d),
- o) unter stringenten Bedingungen mit einem Polynukleotid gemäß (a) bis (i) hybridisierende Polynukleotide, wobei unter stringenten Bedingungen vorzugsweise zu verstehen ist Inkubation bei 60°C in einer Lösung, enthaltend 0,1xSSC und 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS), wobei 20xSSC eine Lösung enthaltend 3 M Natriumchlorid und 0,3 M Natriumcitrat (pH 7.0) bezeichnet,

- p) Polynukleotide, bestehend aus mindestens 200, insbesondere mindestens 250, 300, 350 oder 400, besonders bevorzugt mindestens 450, 500, 550 oder 600, vor allem mindestens 650, 700, 750 oder 800 aufeinanderfolgenden Nucleinsäuren eines Polynukleotids gemäß (a), (b), (d), (e), (f), (g), (h) oder (i),
- q) Polynukleotide mit Deletionen und/oder Insertionen und/oder Inversionen von bis zu 50, vorzugsweise von bis zu 40, 30 oder 20, besonders bevorzugt von bis zu 15, 10 oder 5, insbesondere von bis zu 4, 3 oder 2 Nucleotiden, vor allem Insertionen und/oder Deletionen von genau einem Nucleotid in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (a) bis (p), insbesondere in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (a) oder (e),
- r) Polynukleotide, umfassend mindestens eines der unter (a) bis (q) genannten Polynukleotide,
- s) zu Polynukleotiden gemäß (a) bis (r) komplementäre Polynukleotide.

Die Polynukleotide können als Einzelstrang oder als Doppelstrang vorliegen. Erfindungsgegenstand sind neben den Desoxyribonucleinsäuren auch die homologen und komplementären Ribonucleinsäuren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind insbesondere auch solche Polynukleotide, in denen bestimmte Bereiche unter Berücksichtigung des differierenden Codon-Usage eines für die Expression herangezogenen Wirtsorganismus durch andere Bereiche ersetzt wurden, um die Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids zu ermöglichen.

Entsprechend den oben gemachten Angaben sind unter den oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Nucleinsäuren folgende zunehmend bevorzugt:

- Solche, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie aus einer natürlichen Quelle, insbesondere aus einem Mikroorganismus erhältlich sind;
- hierunter solche, die dadurch gekennzeichnet sind, dass es sich bei dem Mikroorganismus um ein gram-positives Bakterium handelt;
- hierunter solche, die dadurch gekennzeichnet sind, dass es sich bei dem gram-positiven Bakterium um eines der Gattung *Bacillus* handelt; und
- hierunter solche, die dadurch gekennzeichnet sind, dass es sich bei der *Bacillus*-Spezies um *Bacillus gibsonii*, insbesondere um den erfindungsgemäß verwendeten Stamm handelt.

Einen eigenen Erfindungsgegenstand bilden Vektoren, die einen der zuvor bezeichneten, erfindungsgemäßen Nucleinsäurebereiche enthalten, insbesondere einen, der für eines der zuvor bezeichneten erfindungsgemäßen Polypeptide kodiert.

Denn um mit den erfindungsrelevanten Nucleinsäuren umzugehen, und damit insbesondere die Produktion erfindungsgemäßer Polypeptide vorzubereiten, werden sie geeigneterweise in Vektoren ligiert. Solche Vektoren sowie die zugehörigen Arbeitsmethoden sind im Stand der Technik ausführlich beschrieben. Vektoren sind in großer Zahl und Variationsbreite, sowohl für die

Klonierung als auch für die Expression kommerziell erhältlich. Dazu gehören beispielsweise Vektoren, die sich von bakteriellen Plasmiden, von Bacteriophagen oder von Viren ableiten, oder überwiegend synthetische Vektoren. Ferner werden sie nach der Art der Zelltypen, in denen sie sich zu etablieren vermögen, beispielsweise nach Vektoren für gram-negative, für gram-positive Bakterien, für Hefen oder für höhere Eukaryonten unterschieden. Sie bilden geeignete Ausgangspunkte beispielsweise für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen sowie für die Expression des betreffenden Gens oder zugehörigen Proteins.

In einer Ausführungsform handelt es sich bei erfindungsgemäßen Vektoren um Klonierungsvektoren.

Denn Klonierungsvektoren eignen sich neben der Lagerung, der biologischen Amplifikation oder der Selektion des interessierenden Gens für dessen molekularbiologische Charakterisierung. Gleichzeitig stellen sie transportierbare und lagerfähige Formen der beanspruchten Nukleinsäuren dar und sind auch Ausgangspunkte für molekularbiologische Techniken, die nicht an Zellen gebunden sind, wie beispielsweise die PCR oder *In-vitro*-Mutagenese-Verfahren.

Vorzugsweise handelt es sich bei erfindungsgemäßen Vektoren um Expressionsvektoren.

Denn derartige Expressionsvektoren sind die Basis dafür, die entsprechenden Nukleinsäuren in biologischen Produktionssystemen zu realisieren und damit die zugehörigen Proteine zu produzieren. Bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands sind Expressionsvektoren, die zur Expression notwendigen genetischen Elemente tragen, beispielsweise den natürlichen, ursprünglich vor diesem Gen lokalisierten Promotor oder einen Promotor aus einem anderen Organismus. Diese Elemente können beispielsweise in Form einer sogenannten Expressionskassette angeordnet sein. Alternativ können einzelne oder alle Regulationselemente auch von der jeweiligen Wirtszelle bereitgestellt werden. Besonders bevorzugt sind die Expressionsvektoren hinsichtlich weiterer Eigenschaften, wie beispielsweise die optimale Kopienzahl, auf das gewählte Expressionssystem, insbesondere die Wirtszelle (siehe unten) abgestimmt.

Vorteilhaft für eine hohe Expressionsrate ist es weiterhin, wenn der Expressionsvektor möglichst nur das betreffende Gen als Insert enthält und keine größeren 5'- oder 3'-nichtcodierenden Bereiche. Solche Inserts werden beispielsweise erhalten, wenn das nach statistischer Behandlung der chromosomalen DNA des Ausgangsstamms mit einem Restriktionsenzym erhaltene Fragment nach der Sequenzierung vor der Integration in den Expressionsvektor noch einmal gezielt geschnitten worden ist.

Ein Beispiel für einen Expressionsvektor ist der Vektor pAWA22. Weitere Vektoren stehen dem Fachmann aus dem Stand der Technik zur Verfügung und werden in großer Zahl kommerziell angeboten.

Einen eigenen Erfindungsgegenstand bilden Zellen, die nach gentechnischer Modifizierung ein erfindungsgemäßes Polynukleotid enthalten.

Denn diese Zellen enthalten die genetische Information zur Synthese eines erfindungsgemäßen Proteins. Hierunter sind im Gegensatz zu den oben beschriebenen, ebenfalls beanspruchten natürlichen Produzenten diejenigen Zellen gemeint, die nach an sich bekannten Verfahren mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren versehen worden sind, beziehungsweise die sich von solchen Zellen ableiten. Dafür werden geeigneterweise solche Wirtszellen ausgewählt, die sich vergleichsweise einfach kultivieren lassen und/oder hohe Produktausbeuten liefern.

Sie ermöglichen beispielsweise die Amplifikation der entsprechenden Gene, aber auch deren Mutagenese oder Transkription und Translation und letztlich die biotechnologische Produktion der betreffenden Proteine. Diese genetische Information kann entweder extrachromosomal als eigenes genetisches Element, das heißt bei Bakterien in plasmidaler Lokalisation vorliegen oder in ein Chromosom integriert sein. Die Wahl eines geeigneten Systems hängt von Fragestellungen, wie beispielsweise die Art und Dauer der Lagerung des Gens, beziehungsweise des Organismus oder die Art der Mutagenese oder Selektion ab. So sind im Stand der Technik beispielsweise auf Bakteriophagen – und deren spezifischen Wirtszellen – beruhende Mutagenese- und Selektionsverfahren zur Entwicklung von Waschmittelenzymen beschrieben.

Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Polynukleotid Teil eines der oben bezeichneten, erfindungsgemäßen Vektoren, insbesondere eines Klonierungs- oder Expressionsvektors.

Denn hierdurch werden sie zur Realisierung der vorliegenden Erfindung relevant.

Weiterhin sind solche Zellen bevorzugt, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid exprimieren und vorzugsweise sezernieren.

Denn erst die die Proteine bildenden Wirtszellen ermöglichen deren biotechnologische Produktion. Als Wirtszellen zur Proteinexpression eignen sich prinzipiell alle Organismen, das heißt Prokaryonten, Eukaryonten oder Cyanophyta. Bevorzugt sind solche Wirtszellen, die sich genetisch gut handhaben lassen, was beispielsweise die Transformation mit dem Expressionsvektor, dessen stabile Etablierung und die Regulation der Expression angeht, beispielsweise einzellige Pilze oder Bakterien. Zudem zeichnen sich bevorzugte Wirtszellen durch eine gute mikrobiologische und biotechnologische Handhabbarkeit aus. Das betrifft beispielsweise leichte Kultivierbarkeit, hohe Wachstumsraten, geringe Anforderungen an Fermentationsmedien und gute Produktions- und

Sekretionsraten für Fremdproteine. Vorzugsweise werden Laborstämme gewählt, die auf die Expression ausgerichtet sind. Solche sind kommerziell oder über allgemein zugängliche Stammsammlungen erhältlich. Jedes erfindungsgemäße Protein kann auf diese Weise theoretisch aus einer Vielzahl von Wirtsorganismen gewonnen werden. Aus der Fülle an verschiedenen nach dem Stand der Technik zur Verfügung stehenden Systeme müssen die optimalen Expressionssysteme für den Einzelfall experimentell ermittelt werden.

Besonders vorteilhaft sind Wirtszellen, die selbst Protease-negativ sind und somit gebildete Proteine nicht abbauen.

Bevorzugte Ausführungsformen stellen solche Wirtszellen dar, die aufgrund entsprechender genetischer Elemente in ihrer Aktivität regulierbar sind, beispielsweise durch kontrollierte Zugabe von chemischen Verbindungen, durch Änderung der Kultivierungsbedingungen oder in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelldichte. Diese kontrollierbare Expression ermöglicht eine sehr wirtschaftliche Produktion der interessierenden Proteine; sie ist beispielsweise über ein entsprechendes Element auf dem betreffenden Vektor realisierbar. Geeigneterweise sind Gen, Expressionsvektor und Wirtszelle aufeinander abgestimmt, was beispielsweise die zur Expression notwendigen genetischen Elemente (Ribosomen-Bindungsstelle, Promotoren, Terminatoren) oder die Codon-Usage betrifft.

Hierunter sind solche Expressionswirte bevorzugt, die das gebildete Protein ins umgebende Medium sekretieren, weil es dadurch vergleichsweise einfach aufgearbeitet werden kann.

Weiterhin bevorzugt sind Wirtszellen, bei denen es sich um Bakterien handelt.

Denn Bakterien zeichnen sich durch kurze Generationszeiten und geringe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Dadurch können kostengünstige Verfahren etabliert werden. Zudem verfügt man bei Bakterien in der Fermentationstechnik über einen reichhaltigen Erfahrungsschatz. Für eine spezielle Produktion können aus verschiedensten, im Einzelfall experimentell zu ermittelnden Gründen wie Nährstoffquellen, Produktbildungsrate, Zeitbedarf etc. gramnegative oder grampositive Bakterien geeignet sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein gramnegatives Bakterium, insbesondere eines der Gattungen *Escherichia coli* oder *Klebsiella*, insbesondere um Stämme von *E. coli* K12, *E. coli* B oder *Klebsiella planticola*, und ganz besonders um Derivate der Stämme *Escherichia coli* BL21 (DE3), *E. coli* RV308, *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109, *E. coli* XL-1 oder *Klebsiella planticola* (Rf).

Denn bei gramnegativen Bakterien, wie beispielsweise *E. coli*, werden eine Vielzahl von Proteinen in den periplasmatischen Raum sekretiert. Dies kann für spezielle Anwendungen vorteilhaft sein. In der

Anmeldung WO 01/81597 A1 wird ein Verfahren offenbart, nach welchem erreicht wird, daß auch gramnegative Bakterien die exprimierten Proteine ausschleusen. Solch ein System ist auch für die Herstellung erfindungsgemäßer Proteine geeignet. Die als bevorzugt genannten gramnegativen Bakterien sind in der Regel leicht, das heißt kommerziell oder über öffentliche Stammsammlungen zugänglich und im Zusammenspiel mit ebenfalls in großer Zahl zur Verfügung stehenden übrigen Komponenten wie etwa Vektoren auf spezifische Herstellbedingungen hin optimierbar.

In einer alternativen, nicht minder bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein grampositives Bakterium, insbesondere eines der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus* oder *Corynebacterien*, ganz besonders der Species *Bacillus lentus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. globigii*, *B. gibsonii*, *B. pumilus* oder *B. alcalophilus*, *Staphylococcus carnosus* oder *Corynebacterium glutamicum*.

Denn grampositive Bakterien besitzen den gramnegativen gegenüber den grundsätzlichen Unterschied, sekretierte Proteine sogleich in das die Zellen umgebende Nährmedium abzugeben, aus welchem sich, wenn das gewünscht ist, die exprimierten erfindungsgemäßen Proteine direkt aus dem Nährmedium aufreinigen lassen. Zudem sind sie mit den meisten Herkunftsorganismen für technisch wichtige Subtilisine verwandt oder identisch und bilden meist selbst vergleichbare Subtilisine, so daß sie über eine ähnliche Codon-Usage verfügen und ihr Protein-Syntheseapparat naturgemäß entsprechend ausgerichtet ist. Ein weiterer Vorteil kann darin bestehen, daß über dieses Verfahren eine Mischung erfindungsmäßer Proteine mit den endogenen von den Wirtsstämmen gebildeten Subtilisinen erhalten werden kann. Solch eine Coexpression geht ebenfalls aus der Anmeldung WO 91/02792 hervor. Sollte sie nicht gewünscht sein, müßten die in der Wirtszelle natürlicherweise vorhandenen Proteasegene dauerhaft oder vorübergehend inaktiviert werden.

Weiter bevorzugt sind Wirtszellen, bei denen es sich um eukaryontische Zellen, vorzugsweise der Gattung *Saccharomyces* handelt.

Beispiele hierfür sind Pilze wie Actinomyceten oder eben Hefen wie *Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*. Thermophile pilzliche Expressionssysteme werden beispielsweise in WO 96/02653 A1 vorgestellt. Solche eignen sich besonders zur Expression temperaturbeständiger Varianten. Zu den Modifikationen, die eukaryontische Systeme besonders im Zusammenhang mit der Proteinsynthese durchführen, gehören beispielsweise die Bindung niedermolekularer Verbindungen wie Membrananker oder Oligosaccharide. Derartige Oligosaccharid-Modifikationen können beispielsweise zur Senkung der Allergenizität wünschenswert sein. Auch eine Coexpression mit den natürlicherweise von derartigen Zellen gebildeten Enzymen, wie beispielsweise Cellulasen, kann vorteilhaft sein.

Einen eigenständigen Erfindungsgegenstand stellen Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids dar.

Dazu gehört jedes Verfahren zur Herstellung eines oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Polypeptids, beispielsweise chemische Syntheseverfahren.

Demgegenüber bevorzugt sind jedoch alle im Stand der Technik etablierten, oben in einzelnen Aspekten bereits angesprochenen molekularbiologischen, mikrobiologischen, beziehungsweise biotechnologischen Herstellverfahren, die auf den oben bezeichneten erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aufbauen. Hierfür kann entsprechend dem oben Gesagten beispielsweise auf die im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 1 angegebene Nukleinsäuren oder hiervon entsprechend abgeleitete Mutanten oder Teilsequenzen davon zurückgegriffen werden.

Vorzugsweise handelt es sich dabei um Verfahren, die unter Einsatz eines zuvor bezeichneten Vektors und besonders bevorzugt vorzugsweise unter Einsatz einer zuvor bezeichneten, vorteilhafterweise gentechnisch modifizierten Zelle erfolgen. Denn hierdurch wird die entsprechend bevorzugte genetische Information in mikrobiologisch verwertbarer Form zur Verfügung gestellt.

Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können auf der Grundlage der zugehörigen Nukleinsäuresequenzen auch zellfreie Expressionssysteme sein, bei denen die Proteinbiosynthese *in vitro* nachvollzogen wird. Alle bereits oben ausgeführten Elemente können auch zu neuen Verfahren kombiniert werden, um erfindungsgemäße Proteine herzustellen. Es ist dabei für jedes erfindungsgemäße Protein eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten an Verfahrensschritten denkbar, so daß optimale Verfahren für jeden konkreten Einzelfall experimentell ermittelt werden müssen.

Entsprechend dem oben Gesagten sind unter den genannten Verfahren solche bevorzugt, bei denen die Nukleotidsequenz in einem, vorzugsweise mehreren Codons an die Codon-Usage des Wirtsstamms angepaßt worden ist.

Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellen Mittel dar, die zuvor genannte erfindungsgemäße Polypeptide enthalten.

Hiermit werden alle Arten von Mitteln, insbesondere Gemische, Rezepturen, Lösungen etc., deren Einsetzbarkeit durch Zugabe eines oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Proteins verbessert wird, in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Es kann sich dabei je nach Einsatzgebiet beispielsweise um feste Gemische, beispielsweise Pulver mit gefriergetrockneten oder verkapselten Proteinen, oder um gelförmige oder flüssige Mittel handeln. Bevorzugte Rezepturen enthalten beispielsweise Puffersubstanzen, Stabilisatoren, Reaktionspartner und/oder Cofaktoren der Proteasen und/oder andere mit den Proteasen synergistische Inhaltsstoffe. Insbesondere sind darunter Mittel für die weiter unten ausgeführten Einsatzgebiete zu verstehen. Weitere Einsatzgebiete gehen aus dem Stand der Technik hervor und werden beispielsweise in dem

Handbuch „Industrial enzymes and their applications“ von H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998 dargestellt.

Mögliche Einsatzgebiete sind hierbei insbesondere die Verwendung zur Gewinnung oder Behandlung von Rohmaterialien oder Zwischenprodukten in der Textilherstellung, insbesondere zum Entfernen von Schutzschichten auf Geweben, insbesondere auf Wolle oder Seide, sowie die Verwendung zur Pflege von Textilien, die natürliche Fasern, insbesondere Wolle oder Seide, enthalten.

Denn insbesondere natürliche Fasern, wie beispielsweise Wolle oder Seide, zeichnen sich durch eine charakteristische, mikroskopische Oberflächenstruktur aus. Diese kann, wie am Beispiel der Wolle im Artikel von R. Breier in *Melliand Textilberichte* vom 1.4.2000 (S. 263) ausgeführt worden ist, langfristig zu unerwünschten Effekten, wie etwa Verfilzung führen. Zur Vermeidung solcher Effekte werden die natürlichen Rohstoffe mit erfindungsgemäßen Mitteln behandelt, welche beispielsweise dazu beitragen, die auf Proteinstrukturen beruhende geschuppte Oberflächenstruktur zu glätten und damit einem Verfilzen entgegenwirken.

Erfindungsgegenstand sind entsprechend auch Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen und zur Textilpflege, bei denen in wenigstens einem der Verfahrensschritte erfindungsgemäße Polypeptide verwendet werden. Hierunter sind Verfahren für Textilrohstoffe, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen bevorzugt, insbesondere für solche mit Wolle oder Seide. 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.

Weitere mögliche Einsatzgebiete sind etwa

- die Verwendung zur biochemischen Analyse oder zur Synthese von niedermolekularen Verbindungen oder von Proteinen, darunter bevorzugt die Verwendung zur Endgruppenbestimmung im Rahmen einer Peptid-Sequenzanalyse;
- die Verwendung zur Präparation, Reinigung oder Synthese von Naturstoffen oder biologischen Wertstoffen;
- die Verwendung zur Behandlung von natürlichen Rohstoffen, insbesondere zur Oberflächenbehandlung, ganz besonders in einem Verfahren zur Behandlung von Leder, insbesondere zur Enthaarung von Leder;
- die Verwendung zur Behandlung von photographischen Filmen, insbesondere zur Entfernung von gelatinhaltigen oder ähnlichen Schutzschichten; und
- die Verwendung zur Herstellung von Lebensmitteln oder von Futtermitteln, insbesondere zur enzymatischen Behandlung von Sojamilch und/oder Sojamilchprodukten.

Grundsätzlich wird der Einsatz der zuvor genannten erfindungsgemäßen Polypeptide in allen weiteren Technikgebieten, für die er sich als geeignet herausstellt, in den Schutzbereich der vorliegenden Anmeldung eingeschlossen.

Eine weitere erfindungsgemäße Verwendungsmöglichkeit ist der Einsatz der erfindungsgemäßen Polypeptide in kosmetischen Mitteln. Hierunter werden alle Arten von reinigenden und pflegenden Mitteln für menschliche Haut oder menschliches Haar verstanden, insbesondere reinigende Mittel. Bei dem Mittel kann es sich je nach Anwendungszweck auch um ein pharmazeutisches Mittel handeln.

Denn Proteasen spielen auch im Zellerneuerungsprozeß der menschlichen Haut (Desquamation) eine entscheidende Rolle (T. Egelrud et al., *Acta Derm. Venerol.*, Band 71 (1991), S. 471-474). Dementsprechend werden Proteasen auch als bioaktive Komponenten in Hautpflegemitteln verwendet, um den Abbau der in trockener Haut vermehrten Desmosomenstrukturen zu unterstützen. Der Einsatz von Subtilisin-Proteasen mit Aminosäureaustauschen in den Positionen R99G/A/S, S154D/E und/oder L211D/E für kosmetische Zwecke wird beispielsweise in WO 97/07770 A1 beschrieben. Entsprechend dem oben Gesagten können erfindungsgemäße Proteasen über die entsprechenden Punktmutationen weiterentwickelt werden. Somit eignen sich auch erfindungsgemäße Proteasen, insbesondere solche, die etwa nach Mutagenese oder durch Zugabe entsprechender, mit ihnen wechselwirkender Stoffe in ihrer Aktivität kontrolliert sind, als aktive Komponenten in Haut- oder Haar-Reinigungs- oder Pflegemitteln. Besonders bevorzugt sind solche Präparationen dieser Enzyme, die wie oben beschrieben, beispielsweise durch Kopplung an makromolekulare Träger (vergleiche US 5230891) stabilisiert und/oder durch Punktmutationen an hochallergenen Positionen derivatisiert sind, so daß sie für den Menschen eine höhere Hautverträglichkeit aufweisen.

Als Beispiele für erfindungsgemäße kosmetische und/oder pharmazeutische Mittel seien Shampoos, Seifen, Waschlotionen, Cremes, Peelings sowie Mund-, Zahn- oder Zahnprothesenpflegemittel genannt. Diese Mittel können insbesondere auch Bestandteile enthalten, wie sie weiter unten für Wasch- und Reinigungsmittel genannt werden.

Dementsprechend werden auch entsprechende kosmetische Reinigungs- und Pflegeverfahren und die Verwendung derartiger proteolytischer Enzyme zu kosmetischen Zwecken in diesen Erfindungsgegenstand einbezogen, insbesondere in entsprechenden Mitteln, wie beispielsweise Shampoos, Seifen oder Waschlotionen, oder in Pflegemitteln, die beispielsweise in Form von Cremes angeboten werden. Auch die Verwendung in einem schälenden Arzneimittel, beziehungsweise die Verwendung zu dessen Herstellung ist in diesen Gegenstand eingeschlossen.

Einen erfindungsgemäß besonders bevorzugten Gegenstand stellen Wasch- und Reinigungsmittel dar, die erfindungsgemäße Polypeptide enthalten. Denn wie in den Ausführungsbeispielen der

vorliegenden Anmeldung gezeigt wird, konnte für Wasch- und Reinigungsmittel mit einer erfindungsgemäß bevorzugten Protease überraschenderweise eine Steigerung der Waschleistung gegenüber Mitteln mit herkömmlicherweise eingesetzten Proteasen festgestellt werden.

Unter der Waschleistung oder der Reinigungsleistung eines Wasch- beziehungsweise Reinigungsmittels ist im Sinne der vorliegenden Anmeldung der Effekt zu verstehen, den das betrachtete Mittel auf die verschmutzten Artikel, beispielsweise Textilien oder Gegenstände mit harten Oberflächen ausübt. Einzelne Komponenten solcher Mittel, insbesondere die erfindungsgemäßen Enzyme, werden hinsichtlich ihres Beitrags zur Wasch- oder Reinigungsleistung des gesamten Wasch- beziehungsweise Reinigungsmittels beurteilt. Es ist hierbei insbesondere zu berücksichtigen, dass aus den enzymatischen Eigenschaften eines Enzyms nicht ohne weiteres auf seinen Beitrag zur Waschleistung eines Mittels geschlossen werden kann. Vielmehr spielen hier neben der enzymatischen Aktivität insbesondere auch Faktoren wie Stabilität, Substratbindung, Bindung an das Reinigungsgut oder Wechselwirkungen mit anderen Inhaltsstoffen der Wasch- oder Reinigungsmittel, insbesondere auch mögliche Synergieeffekte bei der Entfernung der Verschmutzungen, eine Rolle.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Wasch- und Reinigungsmittel, insbesondere Tensid- und/oder Bleichmittel-haltige, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid enthalten.

Bei den erfindungsgemäßen Wasch- und Reinigungsmitteln kann es sich um alle denkbaren Reinigungsmittelarten handeln, sowohl um Konzentrate als auch um unverdünnt anzuwendende Mittel, zum Einsatz im kommerziellen Maßstab, in der Waschmaschine oder bei der Hand-Wäsche, beziehungsweise -Reinigung. Dazu gehören beispielsweise Waschmittel für Textilien, Teppiche, oder Naturfasern, für die nach der vorliegenden Erfindung 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 solche wird nach der vorliegenden Erfindung die Bezeichnung Reinigungsmittel verwendet. Im weiteren Sinne sind auch Sterilisations- und Desinfektionsmittel als Wasch- und Reinigungsmittel im erfindungsgemäßen Sinne anzusehen.

Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen alle nach den Stand der Technik etablierten und/oder alle zweckmäßigen Darreichungsformen der erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel. Dazu zählen beispielsweise feste, pulverförmige, flüssige, gelförmige oder pastöse Mittel, gegebenenfalls auch aus mehreren Phasen, komprimiert oder nicht komprimiert; ferner gehören beispielsweise dazu: Extrudate, Granulate, Tabletten oder Pouches, sowohl in Großbinden als auch portionsweise abgepackt.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide, insbesondere alkalische Proteasen vom Subtilisin-Typ, 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, ganz besonders bevorzugt von 50 µg bis 10 mg pro Gramm des Mittels. Eingeschlossen werden alle ganzzahligen und nichtganzzahligen jeweils zwischen diesen Zahlen liegenden Werte.

Die Proteaseaktivität in derartigen Mitteln kann nach der in *Tenside*, Band 7 (1970), S. 125-132 beschriebenen Methode ermittelt werden. Sie wird dementsprechend in PE (Protease-Einheiten) angegeben.

Bei dem Vergleich der Leistungen zweier Waschmittelenzyme, wie etwa in den Beispielen der vorliegenden Anmeldung, 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. Hierbei handelt es sich letztlich um eine ökonomische Erwägung.

Neben einem erfindungsgemäßen Polypeptid enthält ein erfindungsgemäßes Wasch- oder Reinigungsmittel gegebenenfalls weitere Inhaltsstoffe wie weitere Enzyme, Enzymstabilisatoren, Tenside, z. B. nichtionische, anionische und/oder amphotere Tenside, und/oder Bleichmittel, und/oder Builder, sowie gegebenenfalls weitere übliche Inhaltsstoffe, die im folgenden ausgeführt werden.

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, zum Beispiel aus Kokos-, Palm-, Talgfett- oder Oleylalkohol, und durchschnittlich 2 bis 8 EO pro Mol Alkohol bevorzugt. Zu den bevorzugten ethoxylierten Alkoholen gehören beispielsweise C₁₂₋₁₄-Alkohole mit 3 EO oder 4 EO, C₉₋₁₁-Alkohol mit 7 EO, C₁₃₋₁₅-Alkohole mit 3 EO, 5 EO, 7 EO oder 8 EO, C₁₂₋₁₈-Alkohole mit 3 EO, 5 EO oder 7 EO und Mischungen aus diesen, wie Mischungen aus C₁₂₋₁₄-Alkohol mit 3 EO und C₁₂₋₁₈-Alkohol mit 5 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 Talgfettalkohol mit 14 EO, 25 EO, 30 EO oder 40 EO.

Eine weitere Klasse bevorzugt eingesetzter nichtionischer Tenside, die entweder als alleiniges nichtionisches Tensid oder in Kombination mit anderen nichtionischen Tensiden eingesetzt werden, sind alkoxylierte, vorzugsweise ethoxylierte oder ethoxylierte und propoxylierte Fettsäurealkylester, vorzugsweise mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Alkylkette, insbesondere Fettsäuremethylester.

Eine weitere Klasse von nichtionischen Tensiden, die vorteilhafterweise eingesetzt werden kann, sind die Alkylpolyglycoside (APG). Einsetzbare Alkylpolyglycoside genügen der allgemeinen Formel $RO(G)_z$, in der R einen linearen oder verzweigten, insbesondere in 2-Stellung methylverzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen Rest mit 8 bis 22, vorzugsweise 12 bis 18 C-Atomen bedeutet und G das Symbol ist, das für eine Glykoseeinheit mit 5 oder 6 C-Atomen, vorzugsweise für Glucose, steht. Der Glycosylierungsgrad z liegt dabei zwischen 1,0 und 4,0, vorzugsweise zwischen 1,0 und 2,0 und insbesondere zwischen 1,1 und 1,4. Bevorzugt eingesetzt werden lineare Alkylpolyglucoside, also Alkylpolyglycoside, in denen der Polyglycosylrest ein Glucoserest und der Alkylrest ein n-Alkylrest ist.

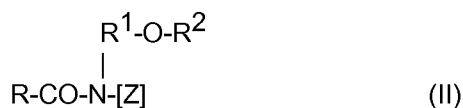
Auch nichtionische Tenside vom Typ der Aminoxide, beispielsweise N-Kokosalkyl--N,N-dimethylaminoxid und N-Talgalkyl-N,N-dihydroxyethylaminoxid, und der Fettsäurealkanolamide können geeignet sein. Der Anteil dieser nichtionischen Tenside liegt vorzugsweise nicht über dem der ethoxylierten Fettalkohole, insbesondere bei nicht mehr als der Hälfte davon.

Weitere geeignete Tenside sind Polyhydroxyfettsäureamide der Formel (I),



in der RCO für einen aliphatischen Acylrest mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, R^1 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. Bei den Polyhydroxyfettsäureamiden handelt es sich um bekannte Stoffe, die üblicherweise durch reduktive Aminierung eines reduzierenden Zuckers mit Ammoniak, einem Alkylamin oder einem Alkanolamin und nachfolgende Acylierung mit einer Fettsäure, einem Fettsäurealkylester oder einem Fettsäurechlorid erhalten werden können.

Zur Gruppe der Polyhydroxyfettsäureamide gehören auch Verbindungen der Formel (II),



in der R für einen linearen oder verzweigten Alkyl- oder Alkenylrest mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, R¹ für einen linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylrest oder einen Arylrest mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen und R² für einen linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylrest oder einen Arylrest oder einen Oxy-Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen steht, wobei C_{1,4}-Alkyl- oder Phenylreste bevorzugt sind und [Z] für einen linearen Polyhydroxyalkylrest steht, dessen Alkylkette mit mindestens zwei Hydroxylgruppen substituiert ist, oder alkoxylierte, vorzugsweise ethoxylierte oder propoxylierte Derivate dieses Restes.

[Z] wird vorzugsweise durch reduktive Aminierung eines reduzierenden Zuckers erhalten, beispielsweise Glucose, Fructose, Maltose, Lactose, Galactose, Mannose oder Xylose. Die N-Alkoxy- oder N-Aryloxy-substituierten Verbindungen können beispielsweise durch Umsetzung mit Fettsäuremethylestern in Gegenwart eines Alkoxids als Katalysator in die gewünschten Polyhydroxyfettsäureamide überführt werden.

Als anionische Tenside werden beispielsweise solche vom Typ der Sulfonate und Sulfate eingesetzt. Als Tenside vom Sulfonat-Typ kommen dabei vorzugsweise C₉₋₁₃-Alkylbenzolsulfonate, Olefinsulfonate, das heißt Gemische aus Alken- und Hydroxyalkansulfonaten sowie Disulfonaten, wie man sie beispielsweise aus C₁₂₋₁₈-Monoolefinen mit end- oder innenständiger Doppelbindung durch Sulfonieren mit gasförmigem Schwefeltrioxid und anschließende Alkalische oder saure Hydrolyse der Sulfonierungsprodukte erhält, in Betracht. Geeignet sind auch Alkansulfonate, die aus C₁₂₋₁₈-Alkanen beispielsweise durch Sulfochlorierung oder Sulfoxidation mit anschließender Hydrolyse beziehungsweise Neutralisation gewonnen werden. Ebenso sind auch die Ester von α-Sulfofettsäuren (Estersulfonate), zum Beispiel die α-sulfonierten Methylester der hydrierten Kokos-, Palmkern- oder Talgfettsäuren geeignet.

Weitere geeignete Aniontenside sind sulfierte Fettsäureglycerinester. Unter Fettsäureglycerinestern sind die Mono-, Di- und Triester sowie deren Gemische zu verstehen, wie sie bei der Herstellung durch Veresterung von einem Monoglycerin mit 1 bis 3 Mol Fettsäure oder bei der Umesterung von Triglyceriden mit 0,3 bis 2 Mol Glycerin erhalten werden. Bevorzugte sulfierte Fettsäureglycerinester sind dabei die Sulfierprodukte von gesättigten Fettsäuren mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, beispielsweise der Capronsäure, Caprylsäure, Caprinsäure, Myristinsäure, Laurinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure oder Behensäure.

Als Alk(en)ylsulfate werden die Alkali- und insbesondere die Natriumsalze der Schwefelsäurehalbesten der C₁₂-C₁₈-Fettalkohole, beispielsweise aus Kokosfettalkohol, Talgfettalkohol, Lauryl-, Myristyl-, Cetyl- oder Stearylalkohol oder der C₁₀-C₂₀-Oxoalkohole und diejenigen Halbesten

sekundärer Alkohole dieser Kettenlängen bevorzugt. Weiterhin bevorzugt sind Alk(en)ylsulfate der genannten Kettenlänge, welche einen synthetischen, auf petrochemischer Basis hergestellten geradkettigen Alkylrest enthalten, die ein analoges Abbauverhalten besitzen wie die adäquaten Verbindungen auf der Basis von fettchemischen Rohstoffen. Aus waschtechnischem Interesse sind die C₁₂-C₁₆-Alkylsulfate und C₁₂-C₁₅-Alkylsulfate sowie C₁₄-C₁₅-Alkylsulfate bevorzugt. Auch 2,3-Alkylsulfate sind geeignete Aniontenside.

Auch die Schwefelsäuremonoester der mit 1 bis 6 Mol Ethylenoxid ethoxylierten geradkettigen oder verzweigten C₇₋₂₁-Alkohole, wie 2-Methyl-verzweigte C₉₋₁₁-Alkohole mit im Durchschnitt 3,5 Mol Ethylenoxid (EO) oder C₁₂₋₁₈-Fettalkohole mit 1 bis 4 EO, sind geeignet. Sie werden in Reinigungsmitteln aufgrund ihres hohen Schaumverhaltens nur in relativ geringen Mengen, beispielsweise in Mengen bis 5 Gew.-%, üblicherweise von 1 bis 5 Gew.-%, eingesetzt.

Weitere geeignete Aniontenside sind auch die Salze der Alkylsulfobernsteinsäure, die auch als Sulfosuccinate oder als Sulfobernsteinsäureester bezeichnet werden und die Monoester und/oder Diester der Sulfobernsteinsäure mit Alkoholen, vorzugsweise Fettalkoholen und insbesondere ethoxylierten Fettalkoholen darstellen. Bevorzugte Sulfosuccinate enthalten C₈₋₁₈-Fettalkoholreste oder Mischungen aus diesen. Insbesondere bevorzugte Sulfosuccinate enthalten einen Fettalkoholrest, der sich von ethoxylierten Fettalkoholen ableitet, die für sich betrachtet nichtionische Tenside darstellen (Beschreibung siehe oben). Dabei sind wiederum Sulfosuccinate, deren Fettalkohol-Reste sich von ethoxylierten Fettalkoholen mit eingengter Homologenverteilung ableiten, besonders bevorzugt. Ebenso ist es auch möglich, Alk(en)ylbernsteinsäure mit vorzugsweise 8 bis 18 Kohlenstoffatomen in der Alk(en)ylkette oder deren Salze einzusetzen.

Als weitere anionische Tenside kommen insbesondere Seifen in Betracht. Geeignet sind gesättigte Fettsäureseifen, wie die Salze der Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, hydrierte Erucasäure und Behensäure sowie insbesondere aus natürlichen Fettsäuren, zum Beispiel Kokos-, Palmkern- oder Talgfettsäuren, abgeleitete Seifengemische.

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.

Die Tenside können in den erfindungsgemäßen Reinigungs- oder Waschmitteln insgesamt in einer Menge von vorzugsweise 5 Gew.-% bis 50 Gew.-%, insbesondere von 8 Gew.-% bis 30 Gew.-%, bezogen auf das fertige Mittel, enthalten sein.

Erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel können Bleichmittel enthalten. Unter den als Bleichmittel dienenden, in Wasser H₂O₂ liefernden Verbindungen haben das Natriumpercarbonat,

das Natriumperborattetrahydrat und das Natriumperboratmonohydrat besondere Bedeutung. Weitere brauchbare Bleichmittel sind beispielsweise Peroxopyrophosphate, Citratperhydrate sowie H_2O_2 liefernde persaurer Salze oder Persäuren, wie Persulfate beziehungsweise Perschwefelsäure. Brauchbar ist auch das Harnstoffperoxyhydrat Percarbamid, das durch die Formel $H_2N-CO-NH_2 \cdot H_2O_2$ beschrieben werden kann. Insbesondere beim Einsatz der Mittel für das Reinigen harter Oberflächen, zum Beispiel beim maschinellen Geschirrspülen, können sie gewünschtenfalls auch Bleichmittel aus der Gruppe der organischen Bleichmittel enthalten, obwohl deren Einsatz prinzipiell auch bei Mitteln für die Textilwäsche möglich ist. Typische organische Bleichmittel sind die Diacylperoxide, wie zum Beispiel Dibenzoylperoxid. Weitere typische organische Bleichmittel sind die Peroxysäuren, wobei als Beispiele besonders die Alkylperoxysäuren und die Arylperoxysäuren genannt werden. Bevorzugte Vertreter sind die Peroxybenzoesäure und ihre ringsubstituierten Derivate, wie Alkylperoxybenzoesäuren, aber auch Peroxy- α -Naphthoesäure und Magnesium-monoperphthalat, die aliphatischen oder substituiert aliphatischen Peroxysäuren, wie Peroxylaurinsäure, Peroxystearinsäure, ϵ -Phthalimidoperoxyacpronsäure (Phthalimidoperoxyhexansäure, PAP), *o*-Carboxybenzamidoperoxyacpronsäure, N-Nonenylamidoperadipinsäure und N-Nonenylamidopersuccinate, und aliphatische und araliphatische Peroxydicarbonsäuren, wie 1,12-Diperoxydicarbonsäure, 1,9-Diperoxyazelaensäure, Diperoxysebacinsäure, Diperoxybrassylsäure, die Diperoxyphthalsäuren, 2-Decyldiperoxybutan-1,4-disäure, N,N-Terephthaloyl-di(6-aminopercapronsäure) können eingesetzt werden.

Der Gehalt der Wasch- oder Reinigungsmittel an Bleichmittel kann 1 bis 40 Gew.-% und insbesondere 10 bis 20 Gew.-% betragen, wobei vorteilhafterweise Perboratmonohydrat oder Percarbonat eingesetzt wird.

Um beim Waschen bei Temperaturen von 60 °C und darunter, und insbesondere bei der Wäschenvorbehandlung eine verbesserte Bleichwirkung zu erreichen, können die Mittel auch Bleichaktivatoren enthalten. 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 Alkylendiamine, insbesondere Tetraacetylenylendiamin (TAED), acylierte Triazinderivate, insbesondere 1,5-Diacetyl-2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazin (DADHT), acylierte Glycolurile, insbesondere 1,3,4,6-Tetraacetyl-glycoluril (TAGU), N-Acylimide, insbesondere N-Nonanoylsuccinimid (NOSI), acylierte Phenolsulfonate, insbesondere *n*-Nonanoyl- oder Isononanoyloxybenzolsulfonat (*n*- beziehungsweise iso-NOBS), acylierte Hydroxycarbonsäuren, wie Triethyl-O-acetylcitrat (TEOC), Carbonsäureanhydride, insbesondere Phthalsäureanhydrid, Isatosäureanhydrid und/oder Bernsteinsäureanhydrid, Carbonsäureamide, wie N-Methyldiacetamid, Glycolid, acylierte mehrwertige Alkohole, insbesondere Triacetin, Ethylenglycoldiacetat, Isopropenylacetat,

2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran und die aus den deutschen Patentanmeldungen DE 196 16 693 und DE 196 16 767 bekannten Enolester sowie acetyliertes Sorbitol und Mannitol beziehungsweise deren in der europäischen Patentanmeldung EP 0 525 239 beschriebene Mischungen (SORMAN), acylierte Zuckerderivate, insbesondere Pentaacetylglucose (PAG), Pentaacetylfructose, Tetraacetylxylose und Octaacetyllactose sowie acetyliertes, gegebenenfalls N-alkyliertes Glucamin beziehungsweise Gluconolacton, Triazol beziehungsweise Triazolderivate und/oder teilchenförmige Caprolactame und/oder Caprolactamderivate, bevorzugt N-acylierte Lactame, beispielsweise N-Benzoylcaprolactam und N-Acetylcaprolactam, die aus den internationalen Patentanmeldungen WO 94/27970, WO 94/28102, WO 94/28103, WO 95/00626, WO 95/14759 und WO 95/17498 bekannt sind. Die aus der deutschen Patentanmeldung DE 196 16 769 bekannten hydrophil substituierten Acylacetale und die in der deutschen Patentanmeldung DE 196 16 770 sowie der internationalen Patentanmeldung WO 95/14075 beschriebenen Acyllactame werden ebenfalls bevorzugt eingesetzt. Auch die aus der deutschen Patentanmeldung DE 44 43 177 bekannten Kombinationen konventioneller Bleichaktivatoren können eingesetzt werden. Ebenso können Nitrilderivate wie Cyanopyridine, Nitrilquats, zum Beispiel N-Alkylammoniumacetonitrile, und/oder Cyanamiderivate eingesetzt werden. Bevorzugte Bleichaktivatoren sind Natrium-4-(octanoyloxy)-benzolsulfonat, *n*-Nonanoyl- oder Isononanoyloxybenzolsulfonat (*n*-beziehungsweise iso-NOBS), Undecenoyloxybenzolsulfonat (UDOBS), Natrium-dodecanoyloxybenzolsulfonat (DOBS), Decanoyloxybenzoesäure (DOBA, OBC 10) und/oder Dodecanoyloxybenzolsulfonat (OBS 12), sowie N-Methylmorpholinum-acetonitril (MMA). Derartige Bleichaktivatoren können im üblichen Mengenbereich von 0,01 bis 20 Gew.-%, vorzugsweise in Mengen von 0,1 bis 15 Gew.-%, insbesondere 1 Gew.-% bis 10 Gew.-%, bezogen auf die gesamte Zusammensetzung, enthalten sein.

Zusätzlich zu den konventionellen Bleichaktivatoren oder an deren Stelle können auch sogenannte Bleichkatalysatoren enthalten sein. Bei diesen Stoffen handelt es sich um bleichverstärkende Übergangsmetallsalze beziehungsweise Übergangsmetallkomplexe wie beispielsweise Mn-, Fe-, Co-, Ru - oder Mo-Salenkomplexe oder -carbonylkomplexe. Auch Mn-, Fe-, Co-, Ru-, Mo-, Ti-, V- und Cu-Komplexe mit N-haltigen Tripod-Liganden sowie Co-, Fe-, Cu- und Ru-Amminkomplexe sind als Bleichkatalysatoren geeignet, wobei solche Verbindungen bevorzugt eingesetzt werden, die in der DE 19709284 A1 beschrieben sind.

Erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel enthalten in der Regel einen oder mehrere Builder, insbesondere Zeolithe, Silikate, Carbonate, organische Cobuilder und - wo keine ökologischen Gründe gegen ihren Einsatz sprechen - auch die Phosphate. Letztere sind insbesondere in Reinigungsmitteln für das maschinelle Geschirrspülen bevorzugt einzusetzende Gerüststoffe.

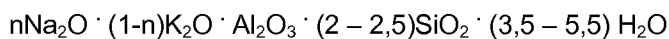
Zu nennen sind hier kristalline, schichtförmige Natriumsilicate der allgemeinen Formel $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$, wobei M Natrium oder Wasserstoff bedeutet, x eine Zahl von 1,6 bis 4,

vorzugsweise 1,9 bis 4,0 und y eine Zahl von 0 bis 20 ist und bevorzugte Werte für x 2, 3 oder 4 sind. Derartige kristalline Schichtsilicate werden beispielsweise in der europäischen Patentanmeldung EP 164514 beschrieben. Bevorzugte kristalline Schichtsilicate der angegebenen Formel sind solche, in denen M für Natrium steht und x die Werte 2 oder 3 annimmt. Insbesondere sind sowohl β - als auch δ -Natriumdisilicate $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ bevorzugt. Im Handel befinden sich derartige Verbindungen beispielsweise unter der Bezeichnung SKS[®] (Firma Clariant). So handelt es sich bei SKS-6[®] vorwiegend um ein δ -Natriumdisilicat mit der Formel $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, bei SKS-7[®] vorwiegend um das β -Natriumdisilicat. Durch Reaktion mit Säuren (zum Beispiel Citronensäure oder Kohlensäure) entsteht aus dem δ -Natriumdisilicat Kanemit $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, im Handel unter den Bezeichnungen SKS-9[®] beziehungsweise SKS-10[®] (Firma Clariant). Von Vorteil kann es auch sein, chemische Modifikationen dieser Schichtsilicate einzusetzen. So kann beispielsweise die Alkalität der Schichtsilicate geeignet beeinflusst werden. Mit Phosphat beziehungsweise mit Carbonat dotierte Schichtsilicate weisen im Vergleich zu dem δ -Natriumdisilicat veränderte Kristallmorphologien auf, lösen sich schneller und zeigen im Vergleich zu δ -Natriumdisilicat ein erhöhtes Calciumbindevermögen. So sind Schichtsilicate der allgemeinen Summenformel $x \text{Na}_2\text{O} \cdot y \text{SiO}_2 \cdot z \text{P}_2\text{O}_5$, in der das Verhältnis x zu y einer Zahl 0,35 bis 0,6, das Verhältnis x zu z einer Zahl von 1,75 bis 1200 und das Verhältnis y zu z einer Zahl von 4 bis 2800 entsprechen, in der Patentanmeldung DE 196 01 063 beschrieben. Die Löslichkeit der Schichtsilicate kann auch erhöht werden, indem besonders feinteilige Schichtsilicate eingesetzt werden. Auch Compounds aus den kristallinen Schichtsilicaten mit anderen Inhaltsstoffen können eingesetzt werden. Dabei sind insbesondere Compounds mit Cellulosederivaten, die Vorteile in der desintegrierenden Wirkung aufweisen und insbesondere in Waschmitteltabletten eingesetzt werden, sowie Compounds mit Polycarboxylaten, zum Beispiel Citronensäure, beziehungsweise polymeren Polycarboxylaten, zum Beispiel Copolymeren der Acrylsäure, zu nennen.

Einsetzbar sind auch amorphe Natriumsilikate mit einem Modul $\text{Na}_2\text{O} : \text{SiO}_2$ von 1:2 bis 1:3,3, vorzugsweise von 1:2 bis 1:2,8 und insbesondere von 1:2 bis 1:2,6, welche löseverzögert sind und Sekundärwascheigenschaften aufweisen. Die Löseverzögerung gegenüber herkömmlichen amorphen Natriumsilikaten kann dabei auf verschiedene Weise, beispielsweise durch Oberflächenbehandlung, Compoundierung, Kompaktierung/ Verdichtung oder durch Übertrocknung hervorgerufen worden sein. Im Rahmen dieser Erfindung wird unter dem Begriff "amorph" auch "röntgenamorph" verstanden. Dies heißt, daß die Silikate bei Röntgenbeugungsexperimenten keine scharfen Röntgenreflexe liefern, wie sie für kristalline Substanzen typisch sind, sondern allenfalls ein oder mehrere Maxima der gestreuten Röntgenstrahlung, die eine Breite von mehreren Gradeinheiten des Beugungswinkels aufweisen. Es kann jedoch sehr wohl sogar zu besonders guten Buildereigenschaften führen, wenn die Silikatpartikel bei Elektronenbeugungsexperimenten verwaschene oder sogar scharfe Beugungsmaxima liefern. Dies ist so zu interpretieren, daß die Produkte mikrokristalline Bereiche der Größe 10 bis einige Hundert nm aufweisen, wobei Werte bis max. 50 nm und insbesondere bis max. 20 nm bevorzugt sind. Insbesondere bevorzugt sind

verdichtete/kompaktierte amorphe Silikate, compoundierte amorphe Silikate und übertrocknete röntgenamorphe Silikate.

Ein gegebenenfalls einsetzbarer, feinkristalliner, synthetischer und gebundenes Wasser enthaltender Zeolith ist vorzugsweise Zeolith A und/oder P. Als Zeolith P wird Zeolith MAP[®] (Handelsprodukt der Firma Crosfield) besonders bevorzugt. Geeignet sind jedoch auch Zeolith X sowie Mischungen aus A, X und/oder P. Kommerziell erhältlich und im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt einsetzbar ist beispielsweise auch ein Co-Kristallisat aus Zeolith X und Zeolith A (ca. 80 Gew.-% Zeolith X), das von der Firma CONDEA Augusta S.p.A. unter dem Markennamen VEGOBOND AX[®] vertrieben wird und durch die Formel



beschrieben werden kann. Geeignete Zeolithe weisen eine mittlere Teilchengröße von weniger als 10 µm (Volumenverteilung; Meßmethode: Coulter Counter) auf und enthalten vorzugsweise 18 bis 22 Gew.-%, insbesondere 20 bis 22 Gew.-% an gebundenem Wasser.

Selbstverständlich ist auch ein Einsatz der allgemein bekannten Phosphate als Buildersubstanzen möglich, sofern ein derartiger Einsatz nicht aus ökologischen Gründen vermieden werden sollte. Unter der Vielzahl der kommerziell erhältlichen Phosphate haben die Alkalimetallphosphate unter besonderer Bevorzugung von Pentanatrium- beziehungsweise Pentakaliumtriphosphat (Natrium- beziehungsweise Kaliumtripolyphosphat) in der Wasch- und Reinigungsmittel-Industrie die größte Bedeutung.

Alkalimetallphosphate ist dabei die summarische Bezeichnung für die Alkalimetall- (insbesondere Natrium- und Kalium-) -Salze der verschiedenen Phosphorsäuren, bei denen man Metaphosphorsäuren $(\text{HPO}_3)_n$ und Orthophosphorsäure H_3PO_4 neben höhermolekularen Vertretern unterscheiden kann. Die Phosphate vereinen dabei mehrere Vorteile in sich: Sie wirken als Alkaliträger, verhindern Kalkbeläge auf Maschinenteilen beziehungsweise Kalkinkrustationen in Geweben und tragen überdies zur Reinigungsleistung bei.

Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4 , existiert als Dihydrat (Dichte $1,91 \text{ gcm}^{-3}$, Schmelzpunkt 60°) und als Monohydrat (Dichte $2,04 \text{ gcm}^{-3}$). Beide Salze sind weiße, in Wasser sehr leicht lösliche Pulver, die beim Erhitzen das Kristallwasser verlieren und bei 200°C in das schwach saure Diphosphat (Dinatriumhydrogendiphosphat, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), bei höherer Temperatur in Natriumtrimetaphosphat ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) und Maddrellsches Salz (siehe unten), übergehen. NaH_2PO_4 reagiert sauer; es entsteht, wenn Phosphorsäure mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt und die Maische versprüht wird. Kaliumdihydrogenphosphat (primäres oder einbasiges Kaliumphosphat, Kaliumbiphosphat, KDP), KH_2PO_4 , ist ein weißes Salz der Dichte $2,33 \text{ gcm}^{-3}$, hat

einen Schmelzpunkt von 253°C [Zersetzung unter Bildung von Kaliumpolyphosphat (KPO_3)] und ist leicht löslich in Wasser.

Dinatriumhydrogenphosphat (sekundäres Natriumphosphat), Na_2HPO_4 , ist ein farbloses, sehr leicht wasserlösliches kristallines Salz. Es existiert wasserfrei und mit 2 Mol. (Dichte $2,066 \text{ g cm}^{-3}$, Wasserverlust bei 95°), 7 Mol. (Dichte $1,68 \text{ g cm}^{-3}$, Schmelzpunkt 48°C unter Verlust von 5 H_2O) und 12 Mol. Wasser (Dichte $1,52 \text{ g cm}^{-3}$, Schmelzpunkt 35°C unter Verlust von 5 H_2O), wird bei 100°C wasserfrei und geht bei stärkerem Erhitzen in das Diphosphat $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ über.

Dinatriumhydrogenphosphat wird durch Neutralisation von Phosphorsäure mit Sodalösung unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator hergestellt. Dikaliumhydrogenphosphat (sekundäres od. zweibasiges Kaliumphosphat), K_2HPO_4 , ist ein amorphes, weißes Salz, das in Wasser leicht löslich ist.

Trinatriumphosphat, tertiäres Natriumphosphat, Na_3PO_4 , sind farblose Kristalle, die als Dodecahydrat eine Dichte von $1,62 \text{ g cm}^{-3}$ und einen Schmelzpunkt von 73–76°C (Zersetzung), als Decahydrat (entsprechend 19–20% P_2O_5) einen Schmelzpunkt von 100°C und in wasserfreier Form (entsprechend 39–40% P_2O_5) eine Dichte von $2,536 \text{ g cm}^{-3}$ aufweisen. Trinatriumphosphat ist in Wasser unter Alkalischer Reaktion leicht löslich und wird durch Eindampfen einer Lösung aus genau 1 Mol Dinatriumphosphat und 1 Mol NaOH hergestellt. Trikaliumphosphat (tertiäres oder dreibasiges Kaliumphosphat), K_3PO_4 , ist ein weißes, zerfließliches, körniges Pulver der Dichte $2,56 \text{ g cm}^{-3}$, hat einen Schmelzpunkt von 1340° und ist in Wasser mit Alkalischer Reaktion leicht löslich. Es entsteht zum Beispiel beim Erhitzen von Thomasschlacke mit Kohle und Kaliumsulfat. Trotz des höheren Preises werden in der Reinigungsmittel-Industrie die leichter löslichen, daher hochwirksamen, Kaliumphosphate gegenüber entsprechenden Natrium-Verbindungen vielfach bevorzugt.

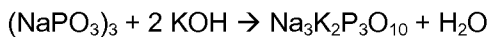
Tetranatriumdiphosphat (Natriumpyrophosphat), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existiert in wasserfreier Form (Dichte $2,534 \text{ g cm}^{-3}$, Schmelzpunkt 988°C, auch 880°C angegeben) und als Decahydrat (Dichte $1,815\text{--}1,836 \text{ g cm}^{-3}$, Schmelzpunkt 94°C unter Wasserverlust). Beide Substanzen sind farblose, in Wasser mit Alkalischer Reaktion lösliche Kristalle. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ entsteht beim Erhitzen von Dinatriumphosphat auf >200°C oder indem man Phosphorsäure mit Soda im stöchiometrischem Verhältnis umsetzt und die Lösung durch Versprühen entwässert. Das Decahydrat komplexiert Schwermetall-Salze und Härtebildner und verringert daher die Härte des Wassers.

Kaliumdiphosphat (Kaliumpyrophosphat), $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existiert in Form des Trihydrats und stellt ein farbloses, hygroskopisches Pulver mit der Dichte $2,33 \text{ g cm}^{-3}$ dar, das in Wasser löslich ist, wobei der pH-Wert der 1%igen Lösung bei 25°C 10,4 beträgt.

Durch Kondensation des NaH_2PO_4 beziehungsweise des KH_2PO_4 entstehen höhermolekulare Natrium- und Kaliumphosphate, bei denen man cyclische Vertreter, die Natrium- beziehungsweise Kaliummetaphosphate und kettenförmige Typen, die Natrium- beziehungsweise Kaliumpolyphosphate, unterscheiden kann. Insbesondere für letztere sind eine Vielzahl von

Bezeichnungen in Gebrauch: Schmelz- oder Glühphosphate, Grahamsches Salz, Kurrolsches und Maddrellsches Salz. Alle höheren Natrium- und Kaliumphosphate werden gemeinsam als kondensierte Phosphate bezeichnet.

Das technisch wichtige Pentanatriumtriphosphat ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$; Natriumtripolyphosphat) ist ein wasserfrei oder mit 6 H_2O kristallisierendes, nicht hygroskopisches, weißes, wasserlösliches Salz der allgemeinen Formel $\text{NaO}[\text{P}(\text{O})(\text{ONa})\text{O}]_n\text{Na}$ mit $n=3$. In 100 g Wasser lösen sich bei Zimmertemperatur etwa 17 g, bei 60°C ca. 20 g, bei 100°C rund 32 g des kristallwasserfreien Salzes; nach zweistündigem Erhitzen der Lösung auf 100°C entstehen durch Hydrolyse etwa 8% Orthophosphat und 15% Diphosphat. Bei der Herstellung von Pentanatriumtriphosphat wird Phosphorsäure mit Sodalösung oder Natronlauge im stöchiometrischen Verhältnis zur Reaktion gebracht und die Lösung durch Versprühen entwässert. Ähnlich wie Grahamsches Salz und Natriumdiphosphat löst Pentanatriumtriphosphat viele unlösliche Metall-Verbindungen (auch Kalkseifen usw.). Pentakaliumtriphosphat, $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (Kaliumtripolyphosphat), kommt beispielsweise in Form einer 50 Gew.-%-igen Lösung ($> 23\% \text{P}_2\text{O}_5$, $25\% \text{K}_2\text{O}$) in den Handel. Die Kaliumpolyphosphate finden in der Wasch- und Reinigungsmittel-Industrie breite Verwendung. Weiter existieren auch Natriumkaliumtripolyphosphate, welche ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzbar sind. Diese entstehen beispielsweise, wenn man Natriumtrimetaphosphat mit KOH hydrolysiert:



Diese sind erfindungsgemäß genau wie Natriumtripolyphosphat, Kaliumtripolyphosphat oder Mischungen aus diesen beiden einsetzbar; auch Mischungen aus Natriumtripolyphosphat und Natriumkaliumtripolyphosphat oder Mischungen aus Kaliumtripolyphosphat und Natriumkaliumtripolyphosphat oder Gemische aus Natriumtripolyphosphat und Kaliumtripolyphosphat und Natriumkaliumtripolyphosphat sind erfindungsgemäß einsetzbar.

Als organische Cobuilder können in den erfindungsgemäßen Wasch- und Reinigungsmitteln insbesondere Polycarboxylate oder Polycarbonsäuren, polymere Polycarboxylate, Polyasparaginsäure, Polyacetale, gegebenenfalls oxidierte Dextrine, weitere organische Cobuilder (siehe unten) sowie Phosphonate eingesetzt werden. Diese Stoffklassen werden nachfolgend beschrieben.

Brauchbare organische Gerüstsubstanzen sind beispielsweise die in Form ihrer Natriumsalze einsetzbaren Polycarbonsäuren, wobei unter Polycarbonsäuren solche Carbonsäuren verstanden werden, die mehr als eine Säurefunktion tragen. Beispielsweise sind dies Citronensäure, Adipinsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Zuckersäuren, Aminocarbonsäuren, Nitrioltriessigsäure (NTA), sofern ein derartiger Einsatz aus ökologischen Gründen nicht zu vermeiden ist, sowie Mischungen aus diesen. Bevorzugte Salze sind

die Salze der Polycarbonsäuren wie Citronensäure, Adipinsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Weinsäure, Zuckersäuren und Mischungen aus diesen.

Auch die Säuren an sich können eingesetzt werden. Sie besitzen neben ihrer Builderwirkung typischerweise auch die Eigenschaft einer Säuerungskomponente und dienen somit auch zur Einstellung eines niedrigeren und mildereren pH-Wertes von Wasch- oder Reinigungsmitteln, sofern nicht der sich durch die Mischung der übrigen Komponenten ergebende pH-Wert gewünscht ist. Insbesondere sind hierbei system- und umweltverträgliche Säuren wie Citronensäure, Essigsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Glykolsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Gluconsäure und beliebige Mischungen aus diesen zu nennen. Aber auch Mineralsäuren, insbesondere Schwefelsäure oder Basen, insbesondere Ammonium- oder Alkalihydroxide können als pH-Regulatoren dienen. Derartige Regulatoren sind in den erfindungsgemäßen Mitteln in Mengen von vorzugsweise nicht über 20 Gew.-%, insbesondere von 1,2 Gew.-% bis 17 Gew.-%, enthalten.

Als Builder sind weiter polymere Polycarboxylate geeignet, dies sind beispielsweise die Alkalimetallsalze der Polyacrylsäure oder der Polymethacrylsäure, beispielsweise solche mit einer relativen Molekülmasse von 500 bis 70 000 g/mol.

Bei den für polymere Polycarboxylate angegebenen Molmassen handelt es sich im Sinne dieser Schrift um gewichtsmittlere Molmassen M_w der jeweiligen Säureform, die grundsätzlich mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmt wurden, wobei ein UV-Detektor eingesetzt wurde. Die Messung erfolgte dabei gegen einen externen Polyacrylsäure-Standard, der aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft mit den untersuchten Polymeren realistische Molgewichtswerte liefert. Diese Angaben weichen deutlich von den Molgewichtsangaben ab, bei denen Polystyrolsulfonsäuren als Standard eingesetzt werden. Die gegen Polystyrolsulfonsäuren gemessenen Molmassen sind in der Regel deutlich höher als die in dieser Schrift angegebenen Molmassen.

Geeignete Polymere sind insbesondere Polyacrylate, die bevorzugt eine Molekülmasse von 2 000 bis 20 000 g/mol aufweisen. Aufgrund ihrer überlegenen Löslichkeit können aus dieser Gruppe wiederum die kurzkettigen Polyacrylate, die Molmassen von 2 000 bis 10 000 g/mol, und besonders bevorzugt von 3 000 bis 5 000 g/mol, aufweisen, bevorzugt sein.

Geeignet sind weiterhin copolymere Polycarboxylate, insbesondere solche der Acrylsäure mit Methacrylsäure und der Acrylsäure oder Methacrylsäure mit Maleinsäure. Als besonders geeignet haben sich Copolymere der Acrylsäure mit Maleinsäure erwiesen, die 50 bis 90 Gew.-% Acrylsäure und 50 bis 10 Gew.-% Maleinsäure enthalten. Ihre relative Molekülmasse, bezogen auf freie Säuren, beträgt im allgemeinen 2 000 bis 70 000 g/mol, vorzugsweise 20 000 bis 50 000 g/mol und insbesondere 30 000 bis 40 000 g/mol. Die (co-) polymeren Polycarboxylate können entweder als Pulver

oder als wässrige Lösung eingesetzt werden. Der Gehalt der Mittel an (co-)polymeren Polycarboxylaten kann von 0,5 bis 20 Gew.-%, insbesondere 1 bis 10 Gew.-%, betragen.

Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit können die Polymere auch Allylsulfonsäuren, wie beispielsweise Allyloxybenzolsulfonsäure und Methallylsulfonsäure, als Monomer enthalten.

Insbesondere bevorzugt sind auch biologisch abbaubare Polymere aus mehr als zwei verschiedenen Monomereinheiten, beispielsweise solche, die als Monomere Salze der Acrylsäure und der Maleinsäure sowie Vinylalkohol beziehungsweise Vinylalkohol-Derivate oder die als Monomere Salze der Acrylsäure und der 2-Alkylallylsulfonsäure sowie Zucker-Derivate enthalten.

Weitere bevorzugte Copolymere sind solche, die als Monomere vorzugsweise Acrolein und Acrylsäure/Acrylsäuresalze beziehungsweise Acrolein und Vinylacetat aufweisen.

Ebenso sind als weitere bevorzugte Buildersubstanzen polymere Aminodicarbonsäuren, deren Salze oder deren Vorläufersubstanzen zu nennen. Besonders bevorzugt sind Polyasparaginsäuren beziehungsweise deren Salze und Derivate.

Weitere geeignete Buildersubstanzen sind Polyacetale, welche durch Umsetzung von Dialdehyden mit Polyolcarbonsäuren, welche 5 bis 7 C-Atome und mindestens 3 Hydroxylgruppen aufweisen, erhalten werden können. Bevorzugte Polyacetale werden aus Dialdehyden wie Glyoxal, Glutaraldehyd, Terephthalaldehyd sowie deren Gemischen und aus Polyolcarbonsäuren wie Gluconsäure und/oder Glucoheptonsäure erhalten.

Weitere geeignete organische Buildersubstanzen sind Dextrine, beispielsweise Oligomere beziehungsweise Polymere von Kohlenhydraten, die durch partielle Hydrolyse von Stärken erhalten werden können. Die Hydrolyse kann nach üblichen, beispielsweise säure- oder enzymkatalysierten Verfahren durchgeführt werden. Vorzugsweise handelt es sich um Hydrolyseprodukte mit mittleren Molmassen im Bereich von 400 bis 500 000 g/mol. Dabei ist ein Polysaccharid mit einem Dextrose-Äquivalent (DE) im Bereich von 0,5 bis 40, insbesondere von 2 bis 30 bevorzugt, wobei DE ein gebräuchliches Maß für die reduzierende Wirkung eines Polysaccharids im Vergleich zu Dextrose ist, welche ein DE von 100 besitzt. Brauchbar sind sowohl Maltodextrine mit einem DE zwischen 3 und 20 und Trockenglucosesirupe mit einem DE zwischen 20 und 37 als auch sogenannte Gelbdextrine und Weißdextrine mit höheren Molmassen im Bereich von 2 000 bis 30 000 g/mol.

Bei den oxidierten Derivaten derartiger Dextrine handelt es sich um deren Umsetzungsprodukte mit Oxidationsmitteln, welche in der Lage sind, mindestens eine Alkoholfunktion des Saccharidrings zur Carbonsäurefunktion zu oxidieren. Besonders bevorzugte organische Builder für erfindungsgemäße

Mittel sind oxidierte Stärken, beziehungsweise deren Derivate aus den Anmeldungen EP 472042, WO 97/25399, und EP 755944.

Auch Oxydisuccinate und andere Derivate von Disuccinaten, vorzugsweise Ethylendiamindisuccinat, sind weitere geeignete Cobuilder. Dabei wird Ethylendiamin-N,N'-disuccinat (EDDS) bevorzugt in Form seiner Natrium- oder Magnesiumsalze verwendet. Weiterhin bevorzugt sind in diesem Zusammenhang auch Glycerindisuccinate und Glycerintrisuccinate. Geeignete Einsatzmengen liegen in zeolith-, carbonat- und/oder silicathaltigen Formulierungen zwischen 3 und 15 Gew.-%.

Weitere brauchbare organische Cobuilder sind beispielsweise acetylierte Hydroxycarbonsäuren beziehungsweise deren Salze, welche gegebenenfalls auch in Lactonform vorliegen können und welche mindestens 4 Kohlenstoffatome und mindestens eine Hydroxygruppe sowie maximal zwei Säuregruppen enthalten.

Eine weitere Substanzklasse mit Cobuildereigenschaften stellen die Phosphonate dar. Dabei handelt es sich insbesondere um Hydroxyalkan- beziehungsweise Aminoalkanphosphonate. Unter den Hydroxyalkanphosphonaten ist das 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonat (HEDP) von besonderer Bedeutung als Cobuilder. Es wird vorzugsweise als Natriumsalz eingesetzt, wobei das Dinatriumsalz neutral und das Tetranatriumsalz alkalisch (pH 9) reagiert. Als Aminoalkanphosphonate kommen vorzugsweise Ethylendiamintetramethylenphosphonat (EDTMP), Diethylentriaminpentamethylenphosphonat (DTPMP) sowie deren höhere Homologe in Frage. Sie werden vorzugsweise in Form der neutral reagierenden Natriumsalze, z. B. als Hexanatriumsalz der EDTMP beziehungsweise als Hepta- und Octa-Natriumsalz der DTPMP, eingesetzt. Als Builder wird dabei aus der Klasse der Phosphonate bevorzugt HEDP verwendet. Die Aminoalkanphosphonate besitzen zudem ein ausgeprägtes Schwermetallbindevermögen. Dementsprechend kann es, insbesondere wenn die Mittel auch Bleiche enthalten, bevorzugt sein, Aminoalkanphosphonate, insbesondere DTPMP, einzusetzen, oder Mischungen aus den genannten Phosphonaten zu verwenden.

Darüberhinaus können alle Verbindungen, die in der Lage sind, Komplexe mit Erdalkalitionen auszubilden, als Cobuilder eingesetzt werden.

Buildersubstanzen können in den erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmitteln gegebenenfalls in Mengen bis zu 90 Gew.-% enthalten sein. Sie sind vorzugsweise in Mengen bis zu 75 Gew.-% enthalten. Erfindungsgemäße Waschmittel weisen Buildergehalte von insbesondere 5 Gew.-% bis 50 Gew.-% auf. In erfindungsgemäßen Mitteln für die Reinigung harter Oberflächen, insbesondere zur maschinellen Reinigung von Geschirr, beträgt der Gehalt an Buildersubstanzen insbesondere 5 Gew.-% bis 88 Gew.-%, wobei in derartigen Mitteln vorzugsweise keine wasserunlöslichen Buildermaterialien eingesetzt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäßer Mittel zur insbesondere maschinellen Reinigung von Geschirr sind 20 Gew.-%

bis 40 Gew.-% wasserlöslicher organischer Builder, insbesondere Alkalicitrat, 5 Gew.-% bis 15 Gew.-% Alkalicarbonat und 20 Gew.-% bis 40 Gew.-% Alkalidisilikat enthalten.

Lösungsmittel, die in den flüssigen bis gelförmigen Zusammensetzungen von Wasch- und Reinigungsmitteln eingesetzt werden können, stammen beispielsweise aus der Gruppe ein- oder mehrwertigen Alkohole, Alkanolamine oder Glycoether, sofern sie im angegebenen Konzentrationsbereich mit Wasser mischbar sind. Vorzugsweise werden die Lösungsmittel ausgewählt aus Ethanol, n- oder i-Propanol, Butanolen, Ethylenglykoldimethylether, Ethylenglykoldiethylether, Ethylenglykolpropylether, Ethylenglykolmono-n-butylether, Diethylenglykoldimethylether, Diethylenglykoldiethylether, Propylenglykoldimethyl-, -ethyl- oder -propyl-ether, Dipropylenglykolmonomethyl-, oder -ethylether, Di-isopropylenglykolmonomethyl-, oder -ethylether, Methoxy-, Ethoxy- oder Butoxytriglykol, 1-Butoxyethoxy-2-propanol, 3-Methyl-3-methoxybutanol, Propylen-glykol-t-butylether sowie Mischungen dieser Lösungsmittel.

Lösungsmittel können in den erfindungsgemäßen flüssigen bis gelförmigen Wasch- und Reinigungsmitteln in Mengen zwischen 0,1 und 20 Gew.-%, bevorzugt aber unter 15 Gew.-% und insbesondere unterhalb von 10 Gew.-% eingesetzt werden.

Zur Einstellung der Viskosität können der erfindungsgemäßen Zusammensetzung ein oder mehrere Verdicker, beziehungsweise Verdickungssysteme zugesetzt werden. Diese hochmolekularen Stoffe, die auch Quell(ungs)mittel genannt werden, saugen meist die Flüssigkeiten auf und quellen dabei auf, um schließlich in zähflüssige echte oder kolloide Lösungen überzugehen.

Geeignete Verdicker sind anorganische oder polymere organische Verbindungen. Zu den anorganischen Verdickern zählen beispielsweise Polykieselsäuren, Tonminerale wie Montmorillonite, Zeolithe, Kieselsäuren und Bentonite. Die organischen Verdicker stammen aus den Gruppen der natürlichen Polymere, der abgewandelten natürlichen Polymere und der vollsynthetischen Polymere. Solche aus der Natur stammenden Polymere sind beispielsweise Agar-Agar, Carrageen, Tragant, Gummi arabicum, Alginate, Pektine, Polyosen, Guar-Mehl, Johannisbrotbaumkernmehl, Stärke, Dextrine, Gelatine und Casein. Abgewandelte Naturstoffe, die als Verdicker verwendet werden, stammen vor allem aus der Gruppe der modifizierten Stärken und Cellulosen. Beispielhaft seien hier Carboxymethylcellulose und andere Celluloseether, Hydroxyethyl- und -propylcellulose sowie Kernmehlether genannt. Vollsynthetische Verdicker sind Polymere wie Polyacryl- und Polymethacryl-Verbindungen, Vinylpolymere, Polycarbonsäuren, Polyether, Polyimine, Polyamide und Polyurethane.

Die Verdicker können in einer Menge bis zu 5 Gew.-%, vorzugsweise von 0,05 bis 2 Gew.-%, und besonders bevorzugt von 0,1 bis 1,5 Gew.-%, bezogen auf die fertige Zusammensetzung, enthalten sein.

Das erfindungsgemäße Wasch- und Reinigungsmittel kann gegebenenfalls als weitere übliche Inhaltsstoffe Sequestrierungsmittel, Elektrolyte und weitere Hilfsstoffe, wie optische Aufheller, Vergrauungsinhibitoren, Silberkorrosionsinhibitoren, Farbübertragungsinhibitoren, Schaum-inhibitoren, Abrasivstoffe, Farb- und/oder Duftstoffe, sowie mikrobielle Wirkstoffe, UV-Absorbenzien und/oder Enzymstabilisatoren enthalten.

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

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.

Um einen Silberkorrosionsschutz zu bewirken, können in erfindungsgemäßen Reinigungsmitteln für Geschirr Silberkorrosionsinhibitoren eingesetzt werden. Solche sind aus dem Stand der Technik bekannt, beispielsweise Benzotriazole, Eisen(III)-chlorid oder CoSO_4 . Wie beispielsweise aus der europäischen Patentschrift EP 0 736 084 B1 bekannt ist, sind für die gemeinsame Verwendung mit Enzymen besonders geeignete Silberkorrosionsinhibitoren Mangan-, Titan-, Zirkonium-, Hafnium-, Vanadium-, Cobalt- oder Cersalze und/oder -komplexe, in denen die genannten Metalle in einer der Oxidationsstufen II, III, IV, V oder VI vorliegen. Beispiele für derartige Verbindungen sind MnSO_4 , V_2O_5 , V_2O_4 , VO_2 , TiOSO_4 , K_2TiF_6 , K_2ZrF_6 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_3$, sowie deren Gemische.

"Soil-Release"-Wirkstoffe oder "Soil-Repellents" sind zumeist Polymere, die bei der Verwendung in einem Waschmittel der Wäschefaser schmutzabstoßende Eigenschaften verleihen und/oder das Schmutzablösevermögen der übrigen Waschmittelbestandteile unterstützen. Ein vergleichbarer Effekt kann auch bei deren Einsatz in Reinigungsmitteln für harte Oberflächen beobachtet werden.

Besonders wirksame und seit langer Zeit bekannte Soil-Release-Wirkstoffe sind Copolyester mit Dicarbonsäure-, Alkylenglykol- und Polyalkylenglykoleinheiten. Beispiele dafür sind Copolymere oder Mischpolymere aus Polyethylenterephthalat und Polyoxyethylenglykol (DT 16 17 141, beziehungsweise DT 22 00 911). In der deutschen Offenlegungsschrift DT 22 53 063 sind saure Mittel genannt, die unter anderem ein Copolymer aus einer dibasischen Carbonsäure und einem Alkylen- oder Cycloalkylenpolyglykol enthalten. Polymere aus Ethylenterephthalat und Polyethylenoxid-terephthalat und deren Einsatz in Waschmitteln sind in den deutschen Schriften DE 28 57 292 und DE 33 24 258 und der Europäischen Patentschrift EP 0 253 567 beschrieben. Das europäische Patent EP 066 944 betrifft Mittel, die einen Copolyester aus Ethylenglykol, Polyethylenglykol, aromatischer Dicarbonsäure und sulfonierter aromatischer Dicarbonsäure in bestimmten Molverhältnissen enthalten. Aus dem europäischen Patent EP 0 185 427 sind Methyl- oder Ethylgruppen-endverschlossene Polyester mit Ethylen- und/oder Propylen-terephthalat- und Polyethylenoxid-terephthalat-Einheiten und Waschmittel, die derartiges Soil-release-Polymer enthalten, bekannt. Das europäische Patent EP 0 241 984 betrifft einen Polyester, der neben Oxyethylen-Gruppen und Terephthalsäureeinheiten auch substituierte Ethyleneinheiten sowie Glycerineinheiten enthält. Aus dem europäischen Patent EP 0 241 985 sind Polyester bekannt, die neben Oxyethylen-Gruppen und Terephthalsäureeinheiten 1,2-Propylen-, 1,2-Butylen- und/oder 3-Methoxy-1,2-propylengruppen sowie Glycerineinheiten enthalten und mit C₁- bis C₄-Alkylgruppen endgruppenverschlossen sind. Aus der europäischen Patentanmeldung EP 0 272 033 sind zumindest anteilig durch C₁₋₄-Alkyl- oder Acylreste endgruppenverschlossene Polyester mit Poly-propylenterephthalat- und Polyoxyethylenterephthalat-Einheiten bekannt. Das europäische Patent EP 0 274 907 beschreibt sulfoethyl-endgruppenverschlossene terephthalathaltige Soil-release-Polyester. Gemäß der europäischen Patentanmeldung EP 0 357 280 werden durch Sulfonierung ungesättigter Endgruppen Soil-Release-Polyester mit Terephthalat-, Alkylenglykol- und Poly-C₂₋₄-Glykol-Einheiten hergestellt. Die internationale Patentanmeldung WO 95/32232 betrifft saure, aromatische schmutzablösevermögende Polyester. Aus der internationalen Patentanmeldung WO 97/31085 sind nicht polymere soil-repellent-Wirkstoffe für Materialien aus Baumwolle mit mehreren funktionellen Einheiten bekannt: Eine erste Einheit, die beispielsweise kationisch sein kann, ist zur Adsorption auf die Baumwollobersfläche durch elektrostatische Wechselwirkung befähigt, und eine zweite Einheit, die hydrophob ausgebildet ist, ist verantwortlich für das Verbleiben des Wirkstoffs an der Wasser/ Baumwolle-Grenzfläche.

Zu den für den Einsatz in erfindungsgemäßen Textilwaschmitteln in Frage kommenden Farbübertragungsinhibitoren gehören insbesondere Polyvinylpyrrolidone, Polyvinylimidazole, polymere N-Oxide wie Poly-(vinylpyridin-N-oxid) und Copolymere von Vinylpyrrolidon mit Vinylimidazol.

Beim Einsatz in maschinellen Reinigungsverfahren kann es von Vorteil sein, den betreffenden Mitteln 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 Bistearylethylendiamid. Mit Vorteilen werden auch Gemische aus verschiedenen Schauminhibitoren verwendet, zum Beispiel solche aus Silikonen, Paraffinen oder Wachsen. Vorzugsweise sind die Schauminhibitoren, insbesondere Silikon- und/oder Paraffin-haltige Schauminhibitoren, an eine granuläre, in Wasser lösliche, beziehungsweise dispergierbare Trägersubstanz gebunden. Insbesondere sind dabei Mischungen aus Paraffinen und Bistearylethylendiamiden bevorzugt.

Ein erfindungsgemäßes Reinigungsmittel für harte Oberflächen kann darüber hinaus abrasiv wirkende Bestandteile, insbesondere aus der Gruppe umfassend Quarzmehle, Holzmehle, Kunststoffmehle, Kreiden und Mikrogaskugeln sowie deren Gemische, enthalten. Abrasivstoffe sind in den erfindungsgemäßen Reinigungsmitteln vorzugsweise in einer Menge von nicht mehr als 20 Gew.-%, insbesondere in einer Menge von 5 bis 15 Gew.-%, enthalten.

Farb- und Duftstoffe werden Wasch- und Reinigungsmitteln zugesetzt, um den ästhetischen Eindruck der Produkte zu verbessern und dem Verbraucher neben der Wasch- und Reinigungsleistung ein visuell und sensorisch "typisches und unverwechselbares" Produkt zur Verfügung zu stellen. Als Parfümöle beziehungsweise Duftstoffe können einzelne Riechstoffverbindungen, zum Beispiel die synthetischen Produkte vom Typ der Ester, Ether, Aldehyde, Ketone, Alkohole und Kohlenwasserstoffe verwendet werden. Riechstoffverbindungen vom Typ der Ester sind zum Beispiel Benzylacetat, Phenoxyethylisobutyrat, p-tert.-Butylcyclohexylacetat, Linalylacetat, Dimethylbenzyl-carbonylacetat, Phenylethylacetat, Linalylbenzoat, Benzylformiat, Ethylmethylphenyl-glycinat, Allylcyclohexylpropionat, Styrallylpropionat und Benzylsalicylat. Zu den Ethern zählen beispielsweise Benzylethylether, zu den Aldehyden zum Beispiel die linearen Alkanale mit 8-18 C-Atomen, Citral, Citronellal, Citronellyloxyacetaldehyd, Cyclamenaldehyd, Hydroxycitronellal, Lilial und Bourgeonal, zu den Ketonen zum Beispiel die Jonone, α -Isomethylionon und Methyl-cedrylketon, zu den Alkoholen Anethol, Citronellol, Eugenol, Geraniol, Linalool, Phenylethylalkohol und Terpeneol, zu den Kohlenwasserstoffen gehören hauptsächlich die Terpene wie Limonen und Pinen. Bevorzugt werden jedoch Mischungen verschiedener Riechstoffe verwendet, die gemeinsam eine ansprechende Duftnote erzeugen. Solche Parfümöle können auch natürliche Riechstoffgemische enthalten, wie sie aus pflanzlichen Quellen zugänglich sind, zum Beispiel Pine-, Citrus-, Jasmin-, Patchouly-, Rosen- oder Ylang-Ylang-Öl. Ebenfalls geeignet sind Muskateller, Salbeiöl, Kamillenöl, Nelkenöl, Melissenöl, Minzöl, Zimtblätteröl, Lindenblütenöl, Wacholderbeeröl, Vetiveröl, Olibanumöl, Galbanumöl und Labdanumöl sowie Orangenblütenöl, Neroliol, Orangenschalenöl und Sandelholzöl. Üblicherweise liegt der Gehalt von Wasch- und Reinigungsmitteln an Farbstoffen unter 0,01 Gew.-%, während Duftstoffe bis zu 2 Gew.-% der gesamten Formulierung ausmachen können.

Die Duftstoffe können direkt in die Wasch- oder Reinigungsmittel eingearbeitet werden, es kann aber auch vorteilhaft sein, die Duftstoffe auf Träger aufzubringen, die die Haftung des Parfüms auf dem Reinigungsgut verstärken und durch eine langsamere Duftfreisetzung für langanhaltenden Duft, insbesondere von behandelten Textilien sorgen. Als solche Trägermaterialien haben sich beispielsweise Cyclodextrine bewährt, wobei die Cyclodextrin-Parfüm-Komplexe zusätzlich noch mit weiteren Hilfsstoffen beschichtet werden können. Ein weiter bevorzugter Träger für Duftstoffe ist der beschriebene Zeolith X, der anstelle von oder in Mischung mit Tensiden auch Duftstoffe aufnehmen kann. Bevorzugt sind daher Wasch- und Reinigungsmittel, die den beschriebenen Zeolith X und Duftstoffe, die vorzugsweise zumindest teilweise an dem Zeolithen absorbiert sind, enthalten.

Bevorzugte Farbstoffe, deren Auswahl dem Fachmann keinerlei Schwierigkeit bereitet, besitzen eine hohe Lagerstabilität und Unempfindlichkeit gegenüber den übrigen Inhaltsstoffen der Mittel und gegen Licht sowie keine ausgeprägte Substantivität gegenüber Textilfasern, um diese nicht anzufärben.

Zur Bekämpfung von Mikroorganismen können Wasch- oder Reinigungsmittel antimikrobielle Wirkstoffe enthalten. Hierbei unterscheidet man je nach antimikrobiellem Spektrum und Wirkungsmechanismus zwischen Bakteriostatika und Bakteriziden, Fungistatika und Fungiziden usw. Wichtige Stoffe aus diesen Gruppen sind beispielsweise Benzalkoniumchloride, Alkylarylsulfonate, Halogenphenole und Phenolmercuriacetat. Die Begriffe antimikrobielle Wirkung und antimikrobieller Wirkstoff haben im Rahmen der erfindungsgemäßen Lehre die fachübliche Bedeutung, die beispielsweise von *K. H. Wallhäußer* in „Praxis der Sterilisation, Desinfektion – Konservierung : Keimidentifizierung – Betriebshygiene“ (5. Aufl. – Stuttgart; New York : Thieme, 1995) wiedergegeben wird, wobei alle dort beschriebenen Substanzen mit antimikrobieller Wirkung eingesetzt werden können. Geeignete antimikrobielle Wirkstoffe sind vorzugsweise ausgewählt aus den Gruppen der Alkohole, Amine, Aldehyde, antimikrobiellen Säuren beziehungsweise deren Salze, Carbonsäureester, Säureamide, Phenole, Phenolderivate, Diphenyle, Diphenylalkane, Harnstoffderivate, Sauerstoff-, Stickstoff-acetale sowie -formale, Benzamide, Isothiazoline, Phthalimidderivate, Pyridinderivate, antimikrobiellen oberflächenaktiven Verbindungen, Guanidine, antimikrobiellen amphoteren Verbindungen, Chinoline, 1,2-Dibrom-2,4-dicyanobutan, Iodo-2-propyl-butyl-carbamat, Iod, Iodophore, Peroxoverbindungen, Halogenverbindungen sowie beliebigen Gemischen der voranstehenden.

Der antimikrobielle Wirkstoff kann dabei ausgewählt sein aus Ethanol, n-Propanol, i-Propanol, 1,3-Butandiol, Phenoxyethanol, 1,2-Propylenglykol, Glycerin, Undecylensäure, Benzoesäure, Salicylsäure, Dihydracetsäure, o-Phenylphenol, N-Methylmorpholin-acetonitril (MMA), 2-Benzyl-4-chlorphenol, 2,2'-Methylen-bis-(6-brom-4-chlorphenol), 4,4'-Dichlor-2'-hydroxydiphenylether (Dichlosan), 2,4,4'-Trichlor-2'-hydroxydiphenylether (Trichlosan), Chlorhexidin, N-(4-Chlorphenyl)-N-(3,4-dichlorphenyl)-harnstoff, N,N'-(1,10-decan-diyl-di-1-pyridinyl-4-yliden)-bis-(1-octanamin)-dihydrochlorid, N,N'-Bis-(4-chlorphe-

nyl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraaza-tetradecandiimidamid, Glucoprotaminen, antimikrobiellen
 oberflächenaktiven quaternären Verbindungen, Guanidinen einschl. den Bi- und Polyguanidinen,
 wie beispielsweise 1,6-Bis-(2-ethylhexyl-biguanido-hexan)-dihydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-phenyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-tetrahydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-phenyl-N₁,N₁-methyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-o-chlorophenyldiguanido- N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-2,6-dichlorophenyldiguanido-N₅,N₅')hexan-dihydrochlorid,
 1,6-Di-[N₁,N₁'-beta-(p-methoxyphenyl) diguanido-N₅,N₅']-hexane-dihydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-alpha-methyl-.beta.-phenyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-p-nitrophenyldiguanido-N₅,N₅')hexan-dihydrochlorid, omega:omega-Di-(
 N₁,N₁'-phenyldiguanido-N₅,N₅')-di-n-propylether-dihydrochlorid,
 omega:omega'-Di-(N₁,N₁'-p-chlorophenyldiguanido-N₅,N₅')-di-n-propylether-tetrahydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-2,4- dichlorophenyldiguanido-N₅,N₅')hexan-tetrahydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-p-methylphenyldiguanido- N₅,N₅')hexan-dihydrochlorid,
 1,6-Di-(N₁,N₁'-2,4,5-trichlorophenyldiguanido-N₅,N₅')hexan-tetrahydrochlorid,
 1,6-Di-[N₁,N₁'-alpha-(p-chlorophenyl) ethyldiguanido-N₅,N₅'] hexan-dihydrochlorid,
 omega:omega-Di-(N₁,N₁'-p-chlorophenyldiguanido-N₅,N₅')m-xylene-dihydrochlorid,
 1,12-Di-(N₁,N₁'-p-chlorophenyldiguanido-N₅,N₅') dodecan-dihydrochlorid,
 1,10-Di-(N₁,N₁'-phenyldiguanido- N₅,N₅')-decan-tetrahydrochlorid, 1,12-Di-(N₁,N₁'-phenyldiguanido-
 N₅,N₅') dodecan-tetrahydrochlorid, 1,6-Di-(N₁,N₁'-o-chlorophenyldiguanido- N₅,N₅')
 hexan-dihydrochlorid, 1,6-Di-(N₁,N₁'-o-chlorophenyldiguanido- N₅,N₅') hexan-tetrahydrochlorid,
 Ethylen-bis-(1-tolyl biguanid), Ethylen-bis-(p-tolyl biguanide),
 Ethylen-bis-(3,5-dimethylphenylbiguanid), Ethylen-bis-(p-tert-amylphenylbiguanid),
 Ethylen-bis-(nonylphenylbiguanid), Ethylen-bis-(phenylbiguanid),
 Ethylen-bis-(N-butylphenylbiguanid), Ethylen-bis (2,5-diethoxyphenylbiguanid), Ethylen-bis
 (2,4-dimethylphenyl biguanid), Ethylen-bis (o-diphenylbiguanid), Ethylen-bis (mixed amyl
 naphthylbiguanid), N-Butyl-ethylen-bis-(phenylbiguanid), Trimethylen bis (o-tolylbiguanid),
 N-Butyl-trimethyle- bis-(phenyl biguanide) und die entsprechenden Salze wie Acetate, Gluconate,
 Hydrochloride, Hydrobromide, Citrate, Bisulfite, Fluoride, Polymaleate, N-Cocosalkylsarcosinate,
 Phosphite, Hypophosphite, Perfluorooctanoate, Silicate, Sorbate, Salicylate, Maleate, Tartrate,
 Fumarate, Ethylendiamintetraacetate, Iminodiacetate, Cinnamate, Thiocyanate, Arginate,
 Pyromellitate, Tetracarboxybutyrate, Benzoate, Glutarate, Monofluorphosphate, Perfluorpropionate
 sowie beliebige Mischungen davon. Weiterhin eignen sich halogenierte Xylo- und Kresolderivate,
 wie p-Chlormetakresol oder p-Chlor-meta-xylol, sowie natürliche antimikrobielle Wirkstoffe
 pflanzlicher Herkunft (zum Beispiel aus Gewürzen oder Kräutern), tierischer sowie mikrobieller
 Herkunft. Vorzugsweise können antimikrobiell wirkende oberflächenaktive quaternäre
 Verbindungen, ein natürlicher antimikrobieller Wirkstoff pflanzlicher Herkunft und/oder ein natürlicher
 antimikrobieller Wirkstoff tierischer Herkunft, äußerst bevorzugt mindestens ein natürlicher
 antimikrobieller Wirkstoff pflanzlicher Herkunft aus der Gruppe, umfassend Coffein, Theobromin und
 Theophyllin sowie etherische Öle wie Eugenol, Thymol und Geraniol, und/oder mindestens ein

natürlicher antimikrobieller Wirkstoff tierischer Herkunft aus der Gruppe, umfassend Enzyme wie Eiweiß aus Milch, Lysozym und Lactoperoxidase, und/oder mindestens eine antimikrobiell wirkende oberflächenaktive quaternäre Verbindung mit einer Ammonium-, Sulfonium-, Phosphonium-, Iodonium- oder Arsoniumgruppe, Peroxoverbindungen und Chlorverbindungen eingesetzt werden. Auch Stoffe mikrobieller Herkunft, sogenannte Bakteriozine, können eingesetzt werden.

Die als antimikrobielle Wirkstoffe geeigneten quaternären Ammoniumverbindungen (QAV) weisen die allgemeine Formel $(R^1)(R^2)(R^3)(R^4) N^+ X^-$ auf, in der R^1 bis R^4 gleiche oder verschiedene C_1 - C_{22} -Alkylreste, C_7 - C_{28} -Aralkylreste oder heterozyklische Reste, wobei zwei oder im Falle einer aromatischen Einbindung wie im Pyridin sogar drei Reste gemeinsam mit dem Stickstoffatom den Heterozyklus, zum Beispiel eine Pyridinium- oder Imidazoliniumverbindung, bilden, darstellen und X^- Halogenidionen, Sulfationen, Hydroxidionen oder ähnliche Anionen sind. Für eine optimale antimikrobielle Wirkung weist vorzugsweise wenigstens einer der Reste eine Kettenlänge von 8 bis 18, insbesondere 12 bis 16, C-Atomen auf.

QAV sind durch Umsetzung tertiärer Amine mit Alkylierungsmitteln, wie zum Beispiel Methylchlorid, Benzylchlorid, Dimethylsulfat, Dodecylbromid, aber auch Ethylenoxid herstellbar. Die Alkylierung von tertiären Aminen mit einem langen Alkyl-Rest und zwei Methyl-Gruppen gelingt besonders leicht, auch die Quaternierung von tertiären Aminen mit zwei langen Resten und einer Methyl-Gruppe kann mit Hilfe von Methylchlorid unter milden Bedingungen durchgeführt werden. Amine, die über drei lange Alkyl-Reste oder Hydroxy-substituierte Alkyl-Reste verfügen, sind wenig reaktiv und werden bevorzugt mit Dimethylsulfat quaterniert.

Geeignete QAV sind beispielweise Benzalkoniumchlorid (N-Alkyl-N,N-dimethyl-benzyl-ammoniumchlorid, CAS No. 8001-54-5), Benzalkon B (*m,p*-Dichlorbenzyl-dimethyl-C12-alkylammoniumchlorid, CAS No. 58390-78-6), Benzoxoniumchlorid (Benzyl-dodecyl-bis-(2-hydroxyethyl)-ammonium-chlorid), Cetrimoniumbromid (N-Hexadecyl-N,N-trimethyl-ammoniumbromid, CAS No. 57-09-0), Benzetoniumchlorid (N,N-Dimethyl-N-[2-[2-[*p*-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-pheno-xy]ethoxy]ethyl]-benzylammoniumchlorid, CAS No. 121-54-0), Dialkyldimethylammonium-chloride wie Di-*n*-decyl-dimethyl-ammoniumchlorid (CAS No. 7173-51-5-5), Didecyl-di-methylammoniumbromid (CAS No. 2390-68-3), Dioctyl-dimethyl-ammoniumchlorid, 1-Cetylpyridiniumchlorid (CAS No. 123-03-5) und Thiazoliniodid (CAS No. 15764-48-1) sowie deren Mischungen. Besonders bevorzugte QAV sind die Benzalkoniumchloride mit C_8 - C_{18} -Alkylresten, insbesondere C_{12} - C_{14} -Alkyl-benzyl-dimethyl-ammoniumchlorid.

Benzalkoniumhalogenide und/oder substituierte Benzalkoniumhalogenide sind beispielsweise kommerziell erhältlich als Barquat[®] ex Lonza, Marquat[®] ex Mason, Variquat[®] ex Witco/ Sherex und Hyamine[®] ex Lonza, sowie Bardac[®] ex Lonza. Weitere kommerziell erhältliche antimikrobielle Wirkstoffe sind N-(3-Chlorallyl)-hexaminiumchlorid wie Dowicide[®] und Dowicil[®] ex Dow,

Benzethoniumchlorid wie Hyamine[®] 1622 ex Rohm & Haas, Methylbenzethoniumchlorid wie Hyamine[®] 10X ex Rohm & Haas, Cetylpyridiniumchlorid wie Cepacolchlorid ex Merrell Labs.

Die antimikrobiellen Wirkstoffe werden in Mengen von 0,0001 Gew.-% bis 1 Gew.-%, bevorzugt von 0,001 Gew.-% bis 0,8 Gew.-%, besonders bevorzugt von 0,005 Gew.-% bis 0,3 Gew.-% und insbesondere von 0,01 bis 0,2 Gew.-% eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel können UV-Absorbenzien (UV-Absorber) enthalten, die auf die behandelten Textilien aufziehen und die Lichtbeständigkeit der Fasern und/oder die Lichtbeständigkeit sonstiger Rezepturbestandteile verbessern. Unter UV-Absorber sind organische Substanzen (Lichtschutzfilter) zu verstehen, die in der Lage sind, ultraviolette Strahlen zu absorbieren und die aufgenommene Energie in Form längerwelliger Strahlung, zum Beispiel Wärme wieder abzugeben.

Verbindungen, die diese gewünschten Eigenschaften aufweisen, sind beispielsweise die durch strahlungslose Desaktivierung wirksamen Verbindungen und Derivate des Benzophenons mit Substituenten in 2- und/oder 4-Stellung. Weiterhin sind auch substituierte Benzotriazole, in 3-Stellung Phenylsubstituierte Acrylate (Zimtsäurederivate, gegebenenfalls mit Cyanogruppen in 2-Stellung), Salicylate, organische Ni-Komplexe sowie Naturstoffe wie Umbelliferon und die körpereigene Urocansäure geeignet. Besondere Bedeutung haben Biphenyl- und vor allem Stilbenderivate wie sie beispielsweise in der EP 0728749 A beschrieben werden und kommerziell als Tinosorb[®] FD oder Tinosorb[®] FR ex Ciba erhältlich sind. Als UV-B-Absorber sind zu nennen: 3-Benzylidencampher beziehungsweise 3-Benzylidennorcampher und dessen Derivate, zum Beispiel 3-(4-Methylbenzyliden)campher, wie in der EP 0693471 B1 beschrieben; 4-Aminobenzoessäurederivate, vorzugsweise 4-(Dimethylamino)benzoessäure-2-ethylhexylester, 4-(Dimethylamino)benzoessäure-2-octylester und 4-(Dimethylamino)benzoessäureamylester; Ester der Zimtsäure, vorzugsweise 4-Methoxyzimtsäure-2-ethylhexylester, 4-Methoxyzimtsäurepropylester, 4-Methoxyzimtsäureisoamylester, 2-Cyano-3,3-phenylzimtsäure-2-ethylhexylester (Octocrylene); Ester der Salicylsäure, vorzugsweise Salicylsäure-2-ethylhexylester, Salicylsäure-4-isopropylbenzylester, Salicylsäurehomomenthylester; Derivate des Benzophenons, vorzugsweise 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon, 2-Hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenon, 2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenon; Ester der Benzalmalonsäure, vorzugsweise 4-Methoxybenzmalonsäuredi-2-ethylhexylester; Triazinderivate, wie zum Beispiel 2,4,6-Triänilino-(p-carbo-2'-ethyl-1'-hexyloxy)-1,3,5-triazin und Octyl Triazon, wie in der EP 0818450 A1 beschrieben oder Dioctyl Butamido Triazone (Uvasorb[®] HEB); Propan-1,3-dione, wie zum Beispiel 1-(4-tert-Butylphenyl)-3-(4'-methoxyphenyl)propan-1,3-dion; Ketotricyclo(5.2.1.0)decan-Derivate, wie in der EP 0694521 B1 beschrieben. Weiterhin geeignet sind 2-Phenylbenzimidazol-5-sulfonsäure und deren Alkali-, Erdalkali-, Ammonium-, Alkylammonium-, Alkanolammonium- und Glucammoniumsalze; Sulfonsäurederivate von Benzophenonen, vorzugsweise 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon-5-sulfonsäure und ihre Salze;

Sulfonsäurederivate des 3-Benzylidenamphers, wie zum Beispiel 4-(2-Oxo-3-bornylidenmethyl)benzol-sulfonsäure und 2-Methyl-5-(2-oxo-3-bornyliden)sulfonsäure und deren Salze.

Als typische UV-A-Filter kommen insbesondere Derivate des Benzoylmethans in Frage, wie beispielsweise 1-(4'-tert-Butylphenyl)-3-(4'-methoxyphenyl)propan-1,3-dion, 4-tert.-Butyl-4'-methoxydibenzoylmethan (Parsol 1789), 1-Phenyl-3-(4'-isopropylphenyl)-propan-1,3-dion sowie Enaminverbindungen, wie beschrieben in der DE 19712033 A1 (BASF). Die UV-A und UV-B-Filter können selbstverständlich auch in Mischungen eingesetzt werden. Neben den genannten löslichen Stoffen kommen für diesen Zweck auch unlösliche Lichtschutzpigmente, nämlich feindisperse, vorzugsweise nanoisierte Metalloxide beziehungsweise Salze in Frage. Beispiele für geeignete Metalloxide sind insbesondere Zinkoxid und Titandioxid und daneben Oxide des Eisens, Zirkoniums, Siliciums, Mangans, Aluminiums und Cers sowie deren Gemische. Als Salze können Silicate (Talk), Bariumsulfat oder Zinkstearat eingesetzt werden. Die Oxide und Salze werden in Form der Pigmente bereits für hautpflegende und hautschützende Emulsionen und dekorative Kosmetik verwendet. Die Partikel sollten dabei einen mittleren Durchmesser von weniger als 100 nm, vorzugsweise zwischen 5 und 50 nm und insbesondere zwischen 15 und 30 nm aufweisen. Sie können eine sphärische Form aufweisen, es können jedoch auch solche Partikel zum Einsatz kommen, die eine ellipsoide oder in sonstiger Weise von der sphärischen Gestalt abweichende Form besitzen. Die Pigmente können auch oberflächenbehandelt, das heißt hydrophilisiert oder hydrophobiert vorliegen. Typische Beispiele sind ummantelte Titandioxide, wie zum Beispiel Titandioxid T 805 (Degussa) oder Eusolex® T2000 (Merck; als hydrophobe Coatingmittel kommen dafür bevorzugt Silicone und besonders bevorzugt Trialkoxyoctylsilane oder Simethicone in Frage. Vorzugsweise wird mikronisiertes Zinkoxid verwendet. Weitere geeignete UV-Lichtschutzfilter sind der Übersicht von P. Finkel in SÖFW-Journal 122 (1996), S. 543 zu entnehmen.

Die UV-Absorbenzen werden üblicherweise in Mengen von 0,01 Gew.-% bis 5 Gew.-%, vorzugsweise von 0,03 Gew.-% bis 1 Gew.-%, eingesetzt.

Erfindungsgemäße Mittel können zur Steigerung der Wasch-, beziehungsweise Reinigungsleistung neben den erfindungsgemäßen Proteinen weitere Enzyme enthalten, wobei prinzipiell alle im Stand der Technik für diese Zwecke etablierten Enzyme einsetzbar sind. Hierzu gehören insbesondere weitere Proteasen, Amylasen, Lipasen, Hemicellulasen, Cellulasen oder Oxidoreduktasen, 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. Erfindungsgemäße Mittel enthalten diese weiteren Enzyme vorzugsweise in Gesamtmengen von 1×10^{-6} bis 5 Gewichts-Prozent bezogen auf aktives Protein.

Unter den weiteren Proteasen sind solche vom Subtilisin-Typ bevorzugt. Beispiele hierfür sind die Subtilisine BPN¹ und Carlsberg, die Protease PB92, die Subtilisine 147 und 309, die Alkalische Protease aus *Bacillus lentus*, Subtilisin DY und die den Subtilisinen, 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, Bagsværd, 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 (WO 91/02792 A1) leiten sich die unter der Bezeichnung BLAP[®] geführten Varianten ab, die insbesondere in WO 92/21760 A1, WO 95/23221 A1, WO 02/088340 A2 und WO 03/038082 A2 beschrieben werden. Weitere verwendbare Proteasen aus verschiedenen *Bacillus sp.*- und *B. gibsonii*-Stämmen gehen aus den Patentanmeldungen WO 03/054185, WO 03/056017, WO 03/055974 und WO 03/054184 hervor.

Weitere brauchbare Proteasen sind beispielsweise die unter den Handelsnamen Durazym[®], Release[®], Everlase[®], Nafizym, Natalase[®], Kannase[®] und Ovozymes[®] von der Firma Novozymes, die unter den Handelsnamen, Purafect[®], Purafect[®] OXP 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.

Beispiele für erfindungsgemäß einsetzbare Amylasen sind die α -Amylasen aus *Bacillus licheniformis*, aus *B. amyloliquefaciens* oder aus *B. stearothermophilus* sowie deren für den Einsatz in Wasch- und 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. Weitere einsetzbare Handelsprodukte sind beispielsweise die Amylase-LT[®] und Stainzyme[®], letztere ebenfalls von der Firma Novozymes.

Desweiteren sind für diesen Zweck die in der Anmeldung WO 02/10356 A2 offenbarte α -Amylase aus *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) und die in der Anmeldung WO 02/44350 A2 beschriebene Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase) aus *B. agaradherens* (DSM 9948) hervorzuheben.

Ferner sind die amylytischen Enzyme einsetzbar, die dem Sequenzraum von α -Amylasen angehören, der in der Anmeldung 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, beispielsweise die aus der Anmeldung DE 10138753 A1.

Darüber hinaus sind die unter den Handelsnamen Fungamyl[®] von der Firma Novozymes erhältlichen Weiterentwicklungen der α -Amylase aus *Aspergillus niger* und *A. oryzae* geeignet. Ein weiteres Handelsprodukt ist beispielsweise die Amylase-LT[®].

Erfindungsgemäße Mittel können Lipasen oder Cutinasen, insbesondere wegen ihrer Triglycerid-spaltenden Aktivitäten enthalten, aber auch, um aus geeigneten Vorstufen *in situ* Persäuren zu erzeugen. Hierzu gehören beispielsweise 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[®], Bacillis 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.

Erfindungsgemäße Mittel können, insbesondere wenn sie für die Behandlung von Textilien gedacht sind, 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.

Eine brauchbare pilzliche, Endoglucanase(EG)-reiche Cellulase-Präparation, beziehungsweise deren Weiterentwicklungen werden 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[®] und Renozyme[®]. Letzteres basiert auf der Anmeldung WO 96/29397 A1. Leistungsverbesserte Cellulase-Varianten

gehen beispielsweise aus der Anmeldung WO 98/12307 A1 hervor. Ebenso sind die in der Anmeldung WO 97/14804 A1 offenbarten Cellulasen einsetzbar; beispielsweise die darin offenbarte 20 kD-EG aus *Melanocarpus*, die von der Firma AB Enzymes, Finnland, unter den Handelsnamen Ecostone[®] und Biotouch[®] erhältlich ist. Weitere Handelprodukte der Firma AB Enzymes sind Econase[®] und Ecopulp[®]. Weitere geeignete Cellulasen aus *Bacillus sp.* CBS 670.93 und CBS 669.93 werden in WO 96/34092 A2 offenbart, 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.

Erfindungsgemäße Mittel können insbesondere zur Entfernung bestimmter Problemanschmutzungen neben den erfindungsgemäßen Polypeptiden weitere Enzyme enthalten, die unter dem Begriff Hemicellulasen zusammengefaßt werden. Hierzu gehören beispielsweise Mannanasen, Xanthanlyasen, Pektinlyasen (=Pektinasen), Pektinesterasen, Pektatlyasen, Xyloglucanasen (=Xylanasen), Pullulanasen und β -Glucanasen. Geeignete Mannanasen sind beispielsweise unter den Namen Gamanase[®] und Pektinex AR[®] von der Firma Novozymes, unter dem Namen Rohapec[®] B1L von der Firma AB Enzymes und unter dem Namen Pyrolase[®] von der Firma Diversa Corp., San Diego, CA, USA erhältlich. Eine geeignete β -Glucanase aus einem *B. alcalophilus* geht beispielsweise aus der Anmeldung WO 99/06573 A1 hervor. Die aus *B. subtilis* gewonnene β -Glucanase ist unter dem Namen Cereflo[®] von der Firma Novozymes erhältlich.

Zur Erhöhung der bleichenden Wirkung können erfindungsgemäße Wasch- und Reinigungsmittel Oxidoreduktasen, beispielsweise Oxidasen, Oxygenasen, Katalasen, Peroxidasen, wie Halo-, Chloro-, Bromo-, Lignin-, Glucose- oder Mangan-peroxidasen, Dioxygenasen oder Laccasen (Phenoloxidasen, Polyphenoloxidasen) enthalten. Als geeignete Handelsprodukte sind Denilite[®] 1 und 2 der Firma Novozymes zu nennen. 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).

Die in erfindungsgemäßen Mitteln zusätzlich 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 filamentöse Fungi.

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.

Erfindungsgemäßen Mitteln können die erfindungsgemäßen Polypeptide ebenso wie die zusätzlich eingesetzten Enzyme in jeder nach dem Stand der Technik etablierten Form zugesetzt werden. Hierzu gehören beispielsweise die durch Granulation, Extrusion oder Lyophilisierung erhaltenen festen Präparationen oder, insbesondere bei flüssigen oder gelförmigen Mitteln, Lösungen der Enzyme, vorteilhafterweise möglichst konzentriert, wasserarm und/oder mit Stabilisatoren versetzt.

Alternativ können diese Proteine sowohl für die feste als auch für die flüssige Darreichungsform verkapselt werden, beispielsweise durch Sprühtrocknung oder Extrusion der Enzymlösung zusammen mit einem, vorzugsweise natürlichen Polymer oder in Form von Kapseln, beispielsweise solchen, bei denen die Enzyme wie in einem erstarrten Gel eingeschlossen sind oder in solchen vom Kern-Schale-Typ, bei dem ein enzymhaltiger Kern mit einer Wasser-, Luft- und/oder Chemikalien-undurchlässigen Schutzschicht überzogen ist. In aufgelagerten Schichten können zusätzlich weitere Wirkstoffe, beispielsweise Stabilisatoren, Emulgatoren, Pigmente, Bleich- oder Farbstoffe aufgebracht werden. Derartige Kapseln werden nach an sich bekannten Methoden, beispielsweise durch Schüttel- oder Rollgranulation oder in Fluid-bed-Prozessen aufgebracht. Vorteilhafterweise sind derartige Granulate, beispielsweise durch Aufbringen polymerer Filmbildner, staubarm und aufgrund der Beschichtung lagerstabil.

Weiterhin ist es möglich, zwei oder mehrere Enzyme, etwa ein erfindungsgemäßes Polypeptid und ein weiteres Enzym, zusammen zu konfektionieren, so dass ein einzelnes Granulat mehrere Enzymaktivitäten aufweist.

Ein in einem erfindungsgemäßen Mittel enthaltenes Protein, insbesondere auch das erfindungsgemäße Polypeptid, kann besonders während der Lagerung gegen Schädigungen wie beispielsweise Inaktivierung, Denaturierung oder Zerfall etwa durch physikalische Einflüsse, Oxidation oder proteolytische Spaltung geschützt werden. Bei mikrobieller Gewinnung der Proteine und/oder Enzyme ist eine Inhibierung der Proteolyse besonders bevorzugt, insbesondere wenn auch die Mittel Proteasen enthalten. Bevorzugte erfindungsgemäße Mittel enthalten zu diesem Zweck Stabilisatoren.

Eine Gruppe von Stabilisatoren sind reversible Proteaseinhibitoren. Häufig werden hierfür Benzamidin-Hydrochlorid, Borax, Borsäuren, Boronsäuren oder deren Salze oder Ester eingesetzt, darunter vor allem Derivate mit aromatischen Gruppen, etwa ortho-, meta- oder para-substituierte Phenylboronsäuren, insbesondere 4-Formylphenyl-Boronsäure, beziehungsweise die Salze oder Ester der genannten Verbindungen. Auch Peptidaldehyde, das heißt Oligopeptide mit reduziertem C-Terminus, insbesondere solche aus 2 bis 50 Monomeren werden zu diesem Zweck eingesetzt. Zu den peptidischen reversiblen Proteaseinhibitoren gehören unter anderem Ovomuroid und Leupeptin. Auch spezifische, reversible Peptid-Inhibitoren für die Protease Subtilisin sowie Fusionsproteine aus Proteasen und spezifischen Peptid-Inhibitoren sind hierfür geeignet.

Weitere Enzymstabilisatoren sind Aminoalkohole wie Mono-, Di-, Triethanol- und -Propanolamin und deren Mischungen, aliphatische Carbonsäuren bis zu C₁₂, wie beispielsweise Bernsteinsäure, andere Dicarbonsäuren oder Salze der genannten Säuren. Auch endgruppenverschlossene Fettsäureamidalkoxylate sind für diesen Zweck geeignet. Bestimmte als Builder eingesetzte organische Säuren vermögen, wie in WO 97/18287 offenbart, zusätzlich ein enthaltenes Enzym zu stabilisieren.

Niedere aliphatische Alkohole, vor allem aber Polyole, wie beispielsweise Glycerin, Ethylenglykol, Propylenglykol oder Sorbit sind weitere häufig eingesetzte Enzymstabilisatoren. Auch Di-Glycerinphosphat schützt gegen Denaturierung durch physikalische Einflüsse. Ebenso werden Calcium- und/oder Magnesiumsalze eingesetzt, wie beispielsweise Calciumacetat oder Calcium-Formiat.

Polyamid-Oligomere oder polymere Verbindungen wie Lignin, wasserlösliche Vinyl-Copolymere oder Cellulose-Ether, Acryl-Polymere und/oder Polyamide stabilisieren die Enzym-Präparation unter anderem gegenüber physikalischen Einflüssen oder pH-Wert-Schwankungen.

Polyamin-N-Oxid-enthaltende Polymere wirken gleichzeitig als Enzymstabilisatoren und als Farbübertragungsinhibitoren. Andere polymere Stabilisatoren sind lineare C₈-C₁₈ Polyoxyalkylene. Auch Alkylpolyglycoside können die enzymatischen Komponenten des erfindungsgemäßen Mittels stabilisieren und vermögen vorzugsweise diese zusätzlich in ihrer Leistung zu steigern. Vernetzte N-haltige Verbindungen erfüllen vorzugsweise eine Doppelfunktion als Soil-Release-Agentien und als Enzym-Stabilisatoren. Hydrophobes, nichtionisches Polymer stabilisiert insbesondere eine gegebenenfalls enthaltene Cellulase.

Reduktionsmittel und Antioxidantien erhöhen die Stabilität der Enzyme gegenüber oxidativem Zerfall; hierfür sind beispielsweise schwefelhaltige Reduktionsmittel geläufig. Andere Beispiele sind Natrium-Sulfit und reduzierende Zucker.

Besonders bevorzugt werden Kombinationen von Stabilisatoren eingesetzt, beispielsweise aus Polyolen, Borsäure und/oder Borax, die Kombination von Borsäure oder Borat, reduzierenden Salzen und Bernsteinsäure oder anderen Dicarbonsäuren oder die Kombination von Borsäure oder Borat mit Polyolen oder Polyaminverbindungen und mit reduzierenden Salzen. Die Wirkung von Peptid-Aldehyd-Stabilisatoren wird günstigerweise durch die Kombination mit Borsäure und/oder Borsäurederivaten und Polyolen gesteigert und noch weiter durch die zusätzliche Wirkung von zweiwertigen Kationen, wie zum Beispiel Calcium-Ionen.

Da erfindungsgemäße Mittel in allen denkbaren Formen angeboten werden können, stellen erfindungsgemäße Polypeptide in allen für die Zugabe zu den jeweiligen Mitteln zweckmäßigen

Formulierungen jeweilige Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar. Dazu gehören beispielsweise flüssige Formulierungen, feste Granulate oder Kapseln.

Die verkapselte Form bietet sich an, um die Enzyme oder andere Inhaltsstoffe vor anderen Bestandteilen, wie beispielsweise Bleichmitteln, zu schützen oder um eine kontrollierte Freisetzung (controlled release) zu ermöglichen. Je nach der Größe dieser Kapseln wird nach Milli-, Mikro- und Nanokapseln unterschieden, wobei Mikrokapseln für Enzyme besonders bevorzugt sind. Solche Kapseln werden beispielsweise mit den Patentanmeldungen WO 97/24177 und DE 19918267 offenbart. Eine mögliche Verkapselungsmethode besteht darin, dass die Proteine, ausgehend von einer Mischung der Proteinlösung mit einer Lösung oder Suspension von Stärke oder einem Stärkederivat, in dieser Substanz verkapselt werden. Ein solches Verkapselungsverfahren wird mit der Anmeldung WO 01/38471 beschrieben.

Im Fall fester Mittel können die Proteine - erfindungsgemäße Polypeptide ebenso wie gegebenenfalls enthaltene weitere Enzyme - beispielsweise in getrockneter, granulierter und/oder verkapselter Form eingesetzt werden. Sie können separat, das heißt als eigene Phase, oder mit anderen Bestandteilen zusammen in derselben Phase, mit oder ohne Kompaktierung zugesetzt werden. Sollen mikroverkapselte Enzyme in fester Form verarbeitet werden, so kann das Wasser mit aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren aus den sich aus der Aufarbeitung ergebenden wäßrigen Lösungen entfernt werden, wie Sprühtrocknung, Abzentrifugieren oder durch Umsolubilisieren. Die auf diese Weise erhaltenen Teilchen haben üblicherweise eine Teilchengröße zwischen 50 und 200 µm.

Flüssigen, gelförmigen oder pastösen erfindungsgemäßen Mitteln können die Proteine ausgehend von einer nach dem Stand der Technik durchgeführten Proteingewinnung und Präparation in konzentrierter wäßriger oder nichtwäßriger Lösung, Suspension oder Emulsion zugesetzt werden, aber auch in Gelform oder verkapselt oder als getrocknetes Pulver. Derartige erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel werden in der Regel durch einfaches Mischen der Inhaltsstoffe hergestellt, die in Substanz oder als Lösung in einen automatischen Mischer gegeben werden können.

Ein erfindungsgemäßes Reinigungsmittel, insbesondere ein erfindungsgemäßer Reiniger für harte Oberflächen, kann auch ein oder mehrere Treibmittel (INCI Propellants), üblicherweise in einer Menge von 1 bis 80 Gew.-%, vorzugsweise 1,5 bis 30 Gew.-%, insbesondere 2 bis 10 Gew.-%, besonders bevorzugt 2,5 bis 8 Gew.-%, äußerst bevorzugt 3 bis 6 Gew.-%, enthalten.

Treibmittel sind erfindungsgemäß üblicherweise Treibgase, insbesondere verflüssigte oder komprimierte Gase. Die Wahl richtet sich nach dem zu versprühenden Produkt und dem Einsatzgebiet. Bei der Verwendung von komprimierten Gasen wie Stickstoff, Kohlendioxid oder Distickstoffoxid, die im allgemeinen in dem flüssigen Reinigungsmittel unlöslich sind, sinkt der

Betriebsdruck mit jeder Ventilbetätigung. Im Reinigungsmittel lösliche oder selbst als Lösungsmittel wirkende verflüssigte Gase (Flüssiggase) als Treibmittel bieten den Vorteil gleichbleibenden Betriebsdrucks und gleichmäßiger Verteilung, denn an der Luft verdampft das Treibmittel und nimmt dabei ein mehrhundertfaches Volumen ein.

Geeignet sind demgemäß folgende gemäß INCI bezeichnete Treibmittel: Butane, Carbon Dioxide, Dimethyl Carbonate, Dimethyl Ether, Ethane, Hydrochlorofluorocarbon 22, Hydrochlorofluorocarbon 142b, Hydrofluorocarbon 152a, Hydrofluorocarbon 134a, Hydrofluorocarbon 227ea, Isobutane, Isopentane, Nitrogen, Nitrous Oxide, Pentane, Propane. Auf Chlorfluorkohlenstoffe (Fluorchlorkohlenwasserstoffe, FCKW) als Treibmittel wird jedoch wegen ihrer schädlichen Wirkung auf den – vor harter UV-Strahlung schützenden – Ozon-Schild der Atmosphäre, die sogenannte Ozon-Schicht, vorzugsweise weitgehend und insbesondere vollständig verzichtet.

Bevorzugte Treibmittel sind Flüssiggase. Flüssiggase sind Gase, die bei meist schon geringen Drücken und 20°C vom gasförmigen in den flüssigen Zustand übergeführt werden können. Insbesondere werden unter Flüssiggasen jedoch die – in Ö raffinerien als Nebenprodukte bei Destillation und Cracken von Erdöl sowie in der Erdgas-Aufbereitung bei der Benzinabscheidung anfallenden – Kohlenwasserstoffe Propan, Propen, Butan, Buten, Isobutan (2-Methylpropan), Isobuten (2-Methylpropan, Isobutylen) und deren Gemische verstanden.

Besonders bevorzugt enthält das Reinigungsmittel als ein oder mehrere Treibmittel Propan, Butan und/oder Isobutan, insbesondere Propan und Butan, äußerst bevorzugt Propan, Butan und Isobutan.

Eine wichtige Aufgabe der Enzympräparation und insbesondere der erfindungsgemäßen Polypeptide ist wie zuvor ausgeführt die primäre Waschleistung. Neben der primären Waschleistung können die in Waschmitteln enthaltenen Proteasen jedoch ferner die Funktion erfüllen, andere enzymatische Bestandteile durch proteolytische Spaltung zu aktivieren oder nach entsprechender Einwirkzeit zu inaktivieren. Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind ebenso solche Mittel mit Kapseln aus proteasesensitivem Material, welche beispielsweise von erfindungsgemäßen Proteinen zu einem beabsichtigten Zeitpunkt hydrolysiert werden und ihren Inhalt freisetzen. Erfindungsgemäße Polypeptide können somit auch zu Inaktivierungs-, Aktivierungs- oder Freisetzungsreaktionen verwendet werden, insbesondere in mehrphasigen Mitteln.

Eine weitere Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstands stellt entsprechend auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptids zur Aktivierung, Deaktivierung oder Freisetzung von Inhaltsstoffen von Wasch- oder Reinigungsmitteln dar.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Mittel mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid so konzipiert, dass es regelmäßig als Pflegemittel verwendet werden kann, beispielsweise indem es

dem Waschprozess zugesetzt, nach dem Waschen angewendet oder unabhängig von dem Waschen appliziert wird. Der gewünschte Effekt besteht darin, eine glatte Oberflächenstruktur des Textils über einen langen Zeitraum zu erhalten und/oder Schädigungen des Gewebes vorzubeugen und/oder zu verringern.

Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellen Verfahren zur maschinellen Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen dar, bei denen wenigstens in einem der Verfahrensschritte ein erfindungsgemäßes Polypeptid verwendet wird.

Darunter sind solche Verfahren bevorzugt, bei denen das erfindungsgemäße Polypeptid 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 wird. Eingeschlossen werden alle ganzzahligen und nichtganzzahligen jeweils zwischen diesen Zahlen liegenden Werte.

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.

Verfahren zur Reinigung von Textilien zeichnen sich im allgemeinen dadurch aus, dass in mehreren Verfahrensschritten verschiedene reinigungsaktive Substanzen auf das Reinigungsgut aufgebracht und nach der Einwirkzeit abgewaschen werden, oder dass das Reinigungsgut in sonstiger Weise mit einem Waschmittel oder einer Lösung dieses Mittels behandelt wird. Das gleiche gilt für Verfahren zur Reinigung von allen anderen Materialien als Textilien, welche unter dem Begriff harte Oberflächen zusammengefasst werden. Alle denkbaren Wasch- oder Reinigungsverfahren können in wenigstens einem der Verfahrensschritte um erfindungsgemäße Proteine bereichert werden, und stellen dann Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar.

Da bevorzugte erfindungsgemäße Polypeptide natürlicherweise bereits eine proteinauflösende Aktivität besitzen und diese auch in Medien entfalten, die sonst keine Reinigungskraft besitzen, wie beispielsweise in bloßem Puffer, kann ein einzelner Teilschritt eines solchen Verfahrens zur maschinellen Reinigung von Textilien darin bestehen, dass gewünschtenfalls neben stabilisierenden Verbindungen, Salzen oder Puffersubstanzen als einzige reinigungsaktive Komponente ein erfindungsgemäßes Polypeptid aufgebracht wird. Dies stellt eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform solcher Verfahren werden die betreffenden erfindungsgemäßen Polypeptide im Rahmen einer der oben ausgeführten Rezepturen für erfindungsgemäße Mittel, vorzugsweise erfindungsgemäße Wasch- beziehungsweise Reinigungsmittel, bereitgestellt.

Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellt die Verwendung einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen Alkalische Protease zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen dar.

Entsprechend bevorzugt gelten für diese Verwendungen die oben ausgeführten Konzentrationsbereiche.

Denn erfindungsgemäße Proteasen können, insbesondere entsprechend den oben beschriebenen Eigenschaften und den oben beschriebenen Verfahren dazu verwendet werden, um von Textilien oder von harten Oberflächen proteinhaltige Verunreinigungen zu beseitigen. Ausführungsformen 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.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Verwendung werden die betreffenden erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen im Rahmen einer der oben ausgeführten Rezepturen für erfindungsgemäße Mittel, vorzugsweise Wasch-, beziehungsweise Reinigungsmittel bereitgestellt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Erzeugnis, enthaltend eine erfindungsgemäße Zusammensetzung bzw. ein erfindungsgemäßes Wasch- oder Reinigungsmittel, insbesondere einen erfindungsgemäßen Reiniger für harte Oberflächen, und einen Sprühspender. Bei dem Erzeugnis kann es sich hierbei sowohl um ein Einkammer- als auch um ein Mehrkammerbehältnis, insbesondere ein Zweikammerbehältnis handeln. Bevorzugt ist der Sprühspender hierbei ein manuell aktivierter Sprühspender, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe umfassend Aerosolsprühspender (Druckgasbehälter; auch u.a. als Spraydose bezeichnet), selbst Druck aufbauende Sprühspender, Pumpsprühspender und Triggersprühspender, insbesondere Pumpsprühspender und Triggersprühspender mit einem Behälter aus transparentem Polyethylen oder Polyethylenterephthalat. Sprühspender werden ausführlicher in der WO 96/04940 (Procter & Gamble) und den darin zu Sprühspendern zitierten US-Patenten, auf die in dieser Hinsicht sämtlich Bezug genommen und deren Inhalt hiermit in diese Anmeldung aufgenommen wird, beschrieben. Triggersprühspender und Pumpzerstäuber besitzen gegenüber Druckgasbehältern den Vorteil, daß kein Treibmittel eingesetzt werden muß. Durch geeignete, partikelgängige Aufsätze, Düsen etc. (sog. "nozzle-Ventile") auf dem Sprühspender kann das Enzym in dieser Ausführungsform gegebenenfalls auch in auf Partikeln immobilisierter Form dem Mittel beigefügt werden und so als Reinigungsschaum dosiert werden.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter, ohne sie darauf zu beschränken.

Ausführungsbeispiele

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: Isolierung und Identifizierung eines proteolytisch aktiven Bakterienstamms

0,1g einer Bodenprobe wurden in 1ml steriler NaCl 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° inkubiert. Anhand eines Klärungshofes wurde ein proteolytisch aktives Bakterium isoliert, welches von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) als *Bacillus gibsonii*. identifiziert wurde.

Tabelle 1: Mikrobiologische Eigenschaften des *Bacillus gibsonii*-Stammes
(Bestimmung der DSMZ)

Eigenschaft	Ergebnis
Zellform	Stäbchen
Breite [µm]	0,9 – 1,1
Länge [µm]	2,0 – >3,0
Sporen	positiv, oval
Sporangium geschwollen	negativ
Anaerobes Wachstum	negativ
VP Reaktion	negativ
pH in VP Medium	6,3
Maximale Temperatur	
Wachstum positiv bei °C	30
Wachstum negativ bei °C	40
Wachstum in	
Medium pH 5,7	negativ
NaCl 2%	positiv
5%	positiv
7%	positiv
10%	positiv
Säure aus (ASS)	
D-Glucose	schwach
L-Arabinose	negativ

D-Xylose	negativ
D-Mannit	schwach
D-Fructose	schwach
Gas aus Glucose	negativ
Lecithinase	negativ
Hydrolyse von	
Stärke	negativ
Gelatine	positiv
Casein	negativ
Tween 80	negativ
Tween 20	negativ
Tween 40	negativ
Tween 60	negativ
Eskulin	negativ
Verwertung von	
Citrat (Koser)	negativ
Propionat	kein Wachstum
NO ₂ aus NO ₃	negativ
Indolreaktion	kein Wachstum
Phenylalanin-desaminase	negativ
Arginin-dihydrolase	negativ
Muster der zellulären Fettsäuren	typisch für Genus <i>Bacillus</i>
Partielle Sequenzierung der 16 S-rDNA	99,6 % Ähnlichkeit zu <i>B. gibsonii</i>

Beispiel 2: Klonierung und Sequenzierung der maturen Protease

Das proteolytisch aktive Bakterium wurde in TBY-Medium (0,5% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, pH 7,4) für 16 Stunden bei 30°C kultiviert. Die Gesamt-DNA dieses Bakteriums wurde isoliert, mit dem Restriktionsenzym *Sau 3A* verdaut und die erhaltenen Fragmente in den Vektor pAWA22 kloniert. Dabei handelt es sich um einen von pBC16 abgeleiteten Expressionsvektor für den Einsatz in *Bacillus*-Spezies (Bernhard et al. (1978), *J. Bacteriol.*, Band 133 (2), S. 897-903). Dieser Vektor wurde in den Wirtstamm *Bacillus subtilis* DB 104 (Kawamura und Doi (1984), *J. Bacteriol.*, Band 160 (1), S. 442-444) transformiert.

Die Transformanten wurden zunächst auf DM3-Medium (8 g/l Agar, 0,5 M Bernsteinsäure, 3,5 g/l K₂HPO₄, 1,5 g/l KH₂PO₄, 20 mM MgCl₂, 5 g/l Casiaminoacids, 5 g/l Hefeextrakt, 6 g/l Glucose, 0,1 g/l BSA) regeneriert und dann auf TBY-Skimmling-Platten (10 g/l Pepton, 10 g/l Milchpulver (siehe oben), 5 g/l Hefe, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar) überimpft. Proteolytisch aktive Klone wurden anhand ihrer

Lysehöfe identifiziert. Aus den erhaltenen proteolytisch aktiven Klonen wurde einer ausgewählt, dessen Plasmid isoliert und das Insert nach Standardmethoden sequenziert.

Das ca. 1,5 kb große Insert enthielt einen offenen Leserahmen von ca. 1,2 kb. Dessen Sequenz ist im Sequenzprotokoll unter der Bezeichnung SEQ ID NO. 1 angegeben. Es umfaßt 1152 bp. Die hiervon abgeleitete Aminosäuresequenz umfaßt 383 Aminosäuren, gefolgt von einem Stopp-Codon. Sie ist im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 2 angegeben. Hiervon sind die ersten 114 Aminosäuren wahrscheinlich nicht im maturen Protein enthalten, so dass sich für das mature Protein voraussichtlich eine Länge von 269 Aminosäuren ergibt.

Diese Sequenzen wurden mit den aus den allgemein zugänglichen Datenbanken Swiss-Prot (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Genf, Schweiz; <http://www.genebio.com/sprot.html>) und GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) erhältlichen Proteasesequenzen verglichen. Als nächstähnliche Enzyme wurden die drei in der folgenden Tabelle 2 zusammengestellten identifiziert.

Tabelle 2: Homologie der Alkalischen Protease aus *Bacillus gibsonii* zu den nächstähnlichen Proteinen.

Darin bedeuten:

- Quelle Dokument, in dem die Sequenz offenbart ist;
 Ident. k. DNA Identität auf DNA-Ebene für die komplette DNA in %;
 Ident. m. DNA Identität auf DNA-Ebene für die für das mature Protein kodierende DNA in %;
 Ident. Proprä. Identität auf Aminosäure-Ebene, bezogen auf das Propräprotein, in %;
 Ident. m. Prot. Identität auf Aminosäure-Ebene, bezogen auf das mature Protein, in %;
 n. nicht in den Datenbanken angegeben.

Enzym	Organismus	Quelle	Ident. k. DNA	Ident. m. DNA	Ident. Proprä.	Ident. m. Prot.
Subtilisin HP302	<i>Bacillus gibsonii</i>	DE102006022216	88	87	96	97
Subtilisin TI-1	<i>Bacillus gibsonii</i>	WO03/054184	88	86	95	96
Subtilisin TII-5	<i>Bacillus gibsonii</i>	WO03/054185	86	84	92	91

Die Aminosäuresequenzen dieser Proteasen werden auch im Alignment der Figur 1 miteinander verglichen.

Beispiel 3: Ermittlung der Waschleistung bei Einsatz in handelsüblichem pulverförmigem Waschmittel

Für dieses Beispiel wurden standardisiert verschmutzte Textilien eingesetzt, die von der Eidgenössischen Material-Prüfungs- und -Versuchsanstalt, St. Gallen, Schweiz (EMPA), oder der

Wäschereiforschungsanstalt, Krefeld, bezogen worden waren. Dabei wurden folgende Anschmutzungen und Textilien verwendet: A (Gras auf Baumwolle, EMPA 164), B (Milch/Öl auf Baumwolle, PC-10), C (Ganzei/Ruß auf Baumwolle, 10N), D (Schokomilch/Ruß auf Baumwolle, C-03), E (Kakao, EMPA 112) sowie F (Blut/Milch auf Baumwolle, C-5 (044)).

Mit diesem Testmaterial wurden verschiedene Waschmittelrezepturen auf ihre Waschleistung 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.

Als Kontroll-Waschmittel diente eine Waschmittel-Basis-Rezeptur folgender Zusammensetzung (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: Schauminhibitoren, optischer Aufheller, Duftstoffe. Die Waschmittel-Basis-Rezeptur wurde für die verschiedenen Versuchsreihen aktivitätsgleich mit folgenden Proteasen versetzt: Subtilisin HP302 (DE102006022216), Subtilisin TI-1 (WO03/054184), Subtilisin TII-5 (WO03/054185), *B. lentus*-Alkalische Protease F 49 (WO 95/23221) beziehungsweise die erfindungsgemäße Protease aus *B. gibsonii*.

Nach dem Waschen wurde der Weißheitsgrad der gewaschenen Textilien gemessen. Die Messung erfolgte an einem Spektrometer Minolta CM508d, Lichtart D65, 10. Das Gerät wird zuvor mit einem mitgelieferten Weißstandard kalibriert. Die erhaltenen Ergebnisse werden als Prozent Remission, das heißt als Prozentangaben im Vergleich zum Weißstandard, zusammen mit den jeweiligen Anfangswerten in Tabelle 3 zusammengestellt. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Messungen. Sie erlauben einen unmittelbaren Rückschluss auf den Beitrag des enthaltenen Enzyms zur Waschleistung des verwendeten Mittels.

Tabelle 3: Waschergebnisse mit pulverförmigem Waschmittel bei 40°C

Basiswaschmittel mit	A	B	C	D	E	F
Erfindungsgemäße Protease aus <i>B. gibsonii</i>	3,6	13,8	5,3	11,4	6,2	11,3
Subtilisin HP302	4,3	13,0	5,6	10,9	7,0	14,4
Subtilisin TII-5	3,6	12,5	6,5	9,5	6,8	12,3
Subtilisin TI-1	4,4	12,2	5,9	9,1	4,7	12,5
<i>B. lentus</i> -Alkalische Protease F 49	1,4	10,6	6,2	2,6	5,2	5,2

Man erkennt, dass die erfindungsgemäße Protease aus *B. gibsonii* bei 40°C an einigen Anschmutzungen die homologen Proteasen HP302, TII-5 und TI-1 übertrifft (Anschmutzungen B und D) und in Bezug auf die anderen Anschmutzungen vergleichbare Werte zu diesen Proteasen liefert und dass die erfindungsgemäße Protease in Bezug auf alle Anschmutzungen mit Ausnahme von Anschmutzung C bessere Werte liefert als die etablierten Protease *B. lentus*-Alkalische Protease F49.

Beispiel 4: Ermittlung der Waschleistung bei Einsatz in einem handelsüblichem Flüssigwaschmittel

Die Versuchsdurchführung erfolgte im Wesentlichen wie in Beispiel 3 beschrieben. Dabei wurden folgende Anschmutzungen und Textilien verwendet: A (Gras auf Baumwolle, EMPA 164), B (Milch/Öl auf Baumwolle, PC-10), C (Ganzei/Ruß auf Baumwolle, 10N), D (Schokomilch/Ruß auf Baumwolle, C-03), E (Kakao, EMPA 112) sowie F (Blut/Milch auf Baumwolle, C-5 (044)).

Mit diesem Testmaterial wurden verschiedene Waschmittelrezepturen auf ihre Waschleistung 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.

Als Kontrollwaschmittel 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, 24-28% Nichtionische Tenside, 1% Borsäure, 1-2% Natriumcitrat (Dihydrat), 2-4% Soda, 14-16% Kokosnuss-Fettsäuren, 0,5% HEDP, 0-0,4% PVP, 0-0,05% optischer Aufheller, 0-0,001% Farbstoff, Rest demineralisiertes Wasser Die Waschmittel-Basis-Rezeptur wurde für die verschiedenen Versuchsreihen aktivitätsgleich mit folgenden Proteasen versetzt: Subtilisin HP302 (DE102006022216), Subtilisin TI-1 (WO03/054184), Subtilisin TII-5 (WO03/054185), *B. lentus*-Alkalische Protease F 49 (WO 95/23221) beziehungsweise die erfindungsgemäße Protease aus *B. gibsonii*.

Nach dem Waschen wurde der Weißheitsgrad der gewaschenen Textilien gemessen. Die Messung erfolgte an einem Spektrometer Minolta CM508d, Lichtart D65, 10. Das Gerät wird zuvor mit einem mitgelieferten Weißstandard kalibriert. Die erhaltenen Ergebnisse werden als Prozent Remission, das heißt als Prozentangaben im Vergleich zum Weißstandard, zusammen mit den jeweiligen Anfangswerten in Tabelle 4 zusammengestellt. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Messungen. Sie erlauben einen unmittelbaren Rückschluss auf den Beitrag des enthaltenen Enzyms zur Waschleistung des verwendeten Mittels.

Tabelle 4: Waschergebnisse mit Flüssigwaschmittel bei 40°C

Basiswaschmittel mit	A	B	C	D	E	F
Erfindungsgemäße Protease aus <i>B. gibsonii</i>	5,0	12,8	5,7	8,8	3,2	23,6
Subtilisin HP302	2,2	10,8	3,9	2,7	3,2	13,1
Subtilisin TII-5	2,0	10,5	4,3	3,9	4,0	14,1
Subtilisin TI-1	3,2	11,2	3,1	4,6	2,4	14,2

Man erkennt, dass die erfindungsgemäße Protease aus *B. gibsonii* bei 40°C in einem Flüssigwaschmittel in Bezug auf alle Anschmutzungen nur mit Ausnahme der Anschmutzung E (Kakao) die homologen Proteasen Subtilisin HP302, Subtilisin TII-5 und Subtilisin TI-1 zum Teil deutlich übertrifft.

Beschreibung der Figuren

Figur 1: Alignment der Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen Protease aus *Bacillus gibsonii* mit den nächstähnlichen bekannten Subtilisinen, jeweils in der maturen, das heißt prozessierten Form.

Folgende Nummern stehen für folgende Proteasen:

- 1 Erfindungsgemäße Protease
- 2 Subtilisin HP302 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in DE102006022216)
- 3 Subtilisin TI-1 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054184)
- 4 Subtilisin TII-5 aus *Bacillus gibsonii* (beschrieben in WO03/054185)

Figur 2: Der von pBC16 abgeleitete Expressionsvektor pAWA22, der einen Promotor aus *B. licheniformis* (*PromPLi*) und stromabwärts davon eine *Bcl* I-Restriktionsschnittstelle aufweist (vergleiche Beispiel 2 und Bernhard et al. (1978), *J. Bacteriol.*, 133 (2), S. 897-903).

Patentansprüche

1. Polynukleotid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
 - b) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 1 bis 342 gemäß SEQ ID NO: 1,
 - c) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 1 bis 81 gemäß SEQ ID NO: 1,
 - d) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 82 bis 342 gemäß SEQ ID NO: 1,
 - e) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 343 bis 1152 gemäß SEQ ID NO: 1,
 - f) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2,
 - g) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 1 bis 114 gemäß SEQ ID NO: 2,
 - h) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 28 bis 114 gemäß SEQ ID NO: 2,
 - i) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 115 bis 383 gemäß SEQ ID NO: 2,
 - j) Polynukleotid kodierend für ein Polypeptid gemäß Anspruch 13,
 - k) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten oder polymorphe Formen oder Allele eines Polynukleotids gemäß (a) oder (e) mit bis zu 80 Mutationen,
 - l) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten oder polymorphe Formen oder Allele eines Polynukleotids gemäß (b) oder (d) mit bis zu 25 Mutationen,
 - m) Polynukleotide mit einer Sequenzhomologie oder -identität von mindestens 90 % in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (a) oder (e),
 - n) Polynukleotide mit einer Sequenzhomologie oder -identität von mindestens 93 % in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (d),
 - o) unter stringenten Bedingungen mit einem Polynukleotid gemäß (a) bis (i) hybridisierende Polynukleotide,
 - p) Polynukleotide bestehend aus mindestens 200 aufeinanderfolgenden Nukleinsäuren eines Polynukleotids gemäß (a), (b), (d), (e), (f), (g), (h) oder (i),
 - q) Polynukleotide mit Deletionen und/oder Insertionen und/oder Inversionen von bis zu 50 Nukleotiden in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (a) bis (p),
 - r) Polynukleotide umfassend mindestens eines der unter (a) bis (q) genannten Polynukleotide,
 - s) zu Polynukleotiden gemäß (a) bis (r) komplementäre Polynukleotide.
2. Polynukleotid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es für eine Hydrolase kodiert.
3. Polynukleotid nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Hydrolase um eine Protease handelt.
4. Polynukleotid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Protease um eine alkalische Protease vom Subtilisin-Typ handelt.

5. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das kodierte Polypeptid dazu in der Lage ist, Peptid-Bindungen zu spalten.
6. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es aus einer natürlichen Quelle, insbesondere aus einem Mikroorganismus, erhältlich ist.
7. Polynukleotid nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Mikroorganismus um ein gram-positives Bakterium handelt.
8. Polynukleotid nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem gram-positiven Bakterium um eines der Gattung Bacillus handelt.
9. Polynukleotid nach vorhergehendem Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Bacillus-Spezies um Bacillus gibsonii handelt.
10. Verfahren zur Herstellung und/oder identifizierung eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid chemisch synthetisiert, anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert oder durch Polymeraseketten-Reaktion erhalten wird.
11. Vektor umfassend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.
12. Vektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Klonierungsvektor oder Expressionsvektor handelt.
13. Polypeptid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2,
 - b) Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 1 bis 114 gemäß SEQ ID NO: 2,
 - c) Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 28 bis 114 gemäß SEQ ID NO: 2,
 - d) Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 115 bis 383 gemäß SEQ ID NO: 2,
 - e) Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von Position 164 bis 382 gemäß SEQ ID NO: 2,
 - f) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten, polymorphe Formen oder Allele eines Polypeptids gemäß (a) mit bis zu 14 Mutationen,
 - g) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten, polymorphe Formen oder Allele eines Polypeptids gemäß (b) oder (c) mit bis zu 4 Mutationen,
 - h) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten, polymorphe Formen oder Allele eines Polypeptids gemäß (d) oder (e) mit bis zu 6 Mutationen,
 - i) Polypeptide, die eine Sequenzhomologie oder-identität von mindestens 96,5 % in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (a) besitzen,

- j) Polypeptide, die eine Sequenzhomologie oder-identität von mindestens 97,5 % in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (d) besitzen,
 - k) Polypeptide, die von einem Polynukleotid gemäß Anspruch 1 kodiert werden,
 - l) Polypeptide, bestehend aus mindestens 81 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz gemäß (a) oder (d),
 - m) Polypeptide, bestehend aus mindestens 127 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz gemäß (a) oder (d), wobei gegebenenfalls eine Abweichung in einer Aminosäureposition vorliegen kann,
 - n) Polypeptide bestehend aus mindestens 171 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz gemäß (a) oder (d), wobei gegebenenfalls Abweichungen in bis zu zwei Aminosäurepositionen vorliegen können,
 - o) Polypeptide bestehend aus mindestens 192 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz gemäß (a) oder (d), wobei gegebenenfalls Abweichungen in bis zu drei Aminosäurepositionen vorliegen können,
 - p) Polypeptide mit Insertionen und/oder Deletionen und/oder Inversionen von bis zu 50 Aminosäuren in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (a) bis (o),
 - q) Polypeptide, umfassend mindestens eines der unter (a) bis (p) genannten Polypeptide.
14. Polypeptid nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Hydrolase handelt.
15. Polypeptid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Hydrolase um eine Protease handelt.
16. Polypeptid nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Protease um eine Alkalische Protease vom Subtilisin-Typ handelt.
17. Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid dazu in der Lage ist, Peptid-Bindungen zu spalten.
18. Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid zusätzlich derivatisiert ist.
19. Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich stabilisiert ist.
20. Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass es aus einem Mikroorganismus erhältlich ist.

21. Polypeptid nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Mikroorganismus um ein gram-positives Bakterium handelt.
22. Polypeptid nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem gram-positivem Bakterium um eines der Gattung *Bacillus* handelt.
23. Polypeptid nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der *Bacillus*-Spezies um *Bacillus gibsonii* handelt.
24. Zelle umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder einen Vektor nach Anspruch 11 oder 12.
25. Zelle, die eines der in den Ansprüchen 13 bis 19 bezeichnetes Polypeptid exprimiert oder zu dessen Expression angeregt werden kann, insbesondere unter Einsatz eines der in den Ansprüchen 1 bis 9 bezeichneten Polynukleotids und/oder unter Einsatz eines Vektors gemäß Anspruch 11 oder 12.
26. Zelle gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Bakterium handelt, insbesondere eines, das das gebildete Protein ins umgebende Medium sezerniert.
27. Zelle nach Anspruch 26, wobei es sich um ein gramnegatives Bakterium handelt, insbesondere eines der Gattungen *Escherichia coli* oder *Klebsiella*, insbesondere um Stämme von *E. coli* K12, *E. coli* B oder *Klebsiella planticola*, und ganz besonders um Derivate der Stämme *Escherichia coli* BL21 (DE3), *E. coli* RV308, *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109, *E. coli* XL-1 oder *Klebsiella planticola* (Rf).
28. Zelle nach Anspruch 26, wobei es sich um ein grampositives Bakterium handelt, insbesondere eines der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus* oder *Corynebacterium*, ganz besonders der Species *Bacillus lentus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. globigii*, *B. gibsonii*, *B. pumilus* oder *B. alcalophilus*, *Staphylococcus carnosus* oder *Corynebacterium glutamicum*.
29. Zelle nach einem der Anspruch 25, wobei es sich um eine eukaryontische Zelle handelt, vorzugsweise eine der Gattung *Saccharomyces*.
30. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Herstellung unter Verwendung eines Polynukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und/oder eines Vektors nach Anspruch 11 oder 12 und/oder einer Zelle nach einem der Ansprüche 24 bis 29 erfolgt, wobei die Nukleinsäuresequenz gegebenenfalls dem Codon-Usage der Wirtszelle angepasst ist.

31. Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 23 enthält.
32. Zusammensetzung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Wasch- oder Reinigungsmittel handelt.
33. Zusammensetzung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein kosmetisches oder pharmazeutisches Mittel handelt.
34. Zusammensetzung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Shampoo, eine Seife, eine Waschlotion, eine Creme, ein Peeling oder ein Mund-, Zahn- oder Zahnprothesenpflegemittel handelt.
35. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Polypeptid 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, ganz besonders bevorzugt von 50 µg bis 10 mg pro g des Mittels enthält.
36. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass sie weitere Enzyme, insbesondere andere Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Oxidoreduktasen und/oder Lipasen enthält.
37. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens eine weitere Komponente enthält, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden, Buildern, Säuren, alkalischen Substanzen, Hydrotropen, Lösungsmitteln, Verdickungsmitteln, Bleichmitteln, Farbstoffen, Parfums, Korrosionsinhibitoren, Sequestriermitteln, Elektrolyten, optischen Aufhellern, Vergrauungsinhibitoren, Silberkorrosionsinhibitoren, Farbübertragungsinhibitoren, Schauminhibitoren, Abrasivstoffen, UV-Absorbenzien, Lösungsmitteln, Abrasivstoffen, Antistatika, Perlglanzmitteln und Hautschutzmitteln.
38. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine feste, gelförmige, pastöse oder flüssige Zusammensetzung handelt.
39. Erzeugnis enthaltend ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 23 oder eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 38 und einen Sprühspender zur Dosierung des Polypeptids und/oder der Zusammensetzung als Aerosol und/oder als Schaum.

40. Verfahren zur maschinellen Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, dass in wenigstens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 23 aktiv wird, insbesondere in einer Menge von 40 µg bis 96 g, vorzugsweise von 50 µg bis 72 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 48 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 24 g pro Anwendung.
41. Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen oder zur Textilpflege, dadurch gekennzeichnet, dass in wenigstens einem der Verfahrensschritte ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 23 aktiv wird, insbesondere für Textilrohstoffe, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen und ganz besonders für solche mit Wolle oder Seide.
42. Verfahren zur Hydrolyse von Biofilmen auf Oberflächen oder zur Entfernung von Schmutzresten von Oberflächen durch Inkubation mit einem Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 23 oder einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 38, gegebenenfalls unter Verwendung eines Erzeugnisses nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die zu behandelnde Oberfläche mit dem Polypeptid und/oder der Zusammensetzung behandelt wird.
43. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23, einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 38 oder eines Erzeugnisses nach Anspruch 39 zur Zerstörung und/oder Entfernung von Biofilmen und/oder zur Entfernung von Schmutzresten von Oberflächen und/oder zur Reinigung von Textilien.
44. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur Aktivierung oder Deaktivierung von Inhaltsstoffen von Wasch- oder Reinigungsmitteln.
45. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23, einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 38 oder eines Erzeugnisses nach Anspruch 39 zur hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen.
46. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur biochemischen Analyse oder zur Synthese von niedermolekularen Verbindungen oder von Proteinen.
47. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur Präparation, Reinigung oder Synthese von Naturstoffen oder biologischen Wertstoffen.
48. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur Behandlung von natürlichen Rohstoffen, insbesondere zur Oberflächenbehandlung, ganz besonders in einem Verfahren zur Behandlung von Leder.

49. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur Gewinnung oder Behandlung von Rohmaterialien oder Zwischenprodukten in der Textilherstellung, insbesondere zum Entfernen von Schutzschichten auf Geweben.
50. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur Behandlung von Textilrohstoffen oder zur Textilpflege, insbesondere zur Behandlung von Wolle oder Seide oder woll- oder seidenhaltigen Mischtextilien.
51. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur Behandlung von photographischen Filmen, insbesondere zur Entfernung von gelatinhaltigen oder ähnlichen Schutzschichten.
52. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur Herstellung von Lebensmitteln oder von Futtermitteln.
53. Erzeugnis aus einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 bis 38 und einer Mehrkammerflasche.
54. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 23 zur Herstellung einer kosmetischen oder pharmazeutischen Zusammensetzung.

Figur 1

70

1 QQTVPWGITR VQAPAVHNRG VTGSGVRVAI LDSGISQHS D LTIIRGGASFV PGEPTT EDLN GHGTHVAGTV
 1 QQTVPWGITR VQAPAVHNRG VTGSGVRVAI LDSGISQHS D LTIIRGGASFV PGEPTTADLN GHGTHVAGTV
 2 QQTVPWGITR VQAPAVHNRG VTGSGVRVAI LDSGISQHS D LTIIRGGASFV PGEPTTADLN GHGTHVAGTV
 3 QQTVPWGITR VQAPAVHNRG VTGSGVRVAI LDSGISTHSD LTIIRGGASFV PGEPTTADLN GHGTHVAGTV
 4 QQTVPWGITR VQAPAVHNRG ITGSGVKVAI LDTGIAQHS D LTIIRGGASFV PGESTTADLN GHGTHVAGTV

71 140

1 AALNNSFGVI GVAPSADLYA VKVLGAG GRG SVSGIAQGLE WAAANNMHIA NMSLGADAPS STLERAVNYA
 2 AALNNSIGVI GVAPSADLYA VKVLGANGRG SVSGIAQGLE WAAANNMHIA NMSLGADAPS STLERAVNYA
 3 AALNNSIGVI G VAPSADLYA VKVLGANGRG SVSGIAQGLE WAAANNMHIA NMSLGSDAPS ITLERAVNYA
 4 AALNNSIGVI GVAPSADLYA VKVLGANGRG SVSGIAQGLE WAAANNMHIA NMSLGSDAPS TILERAVNYA

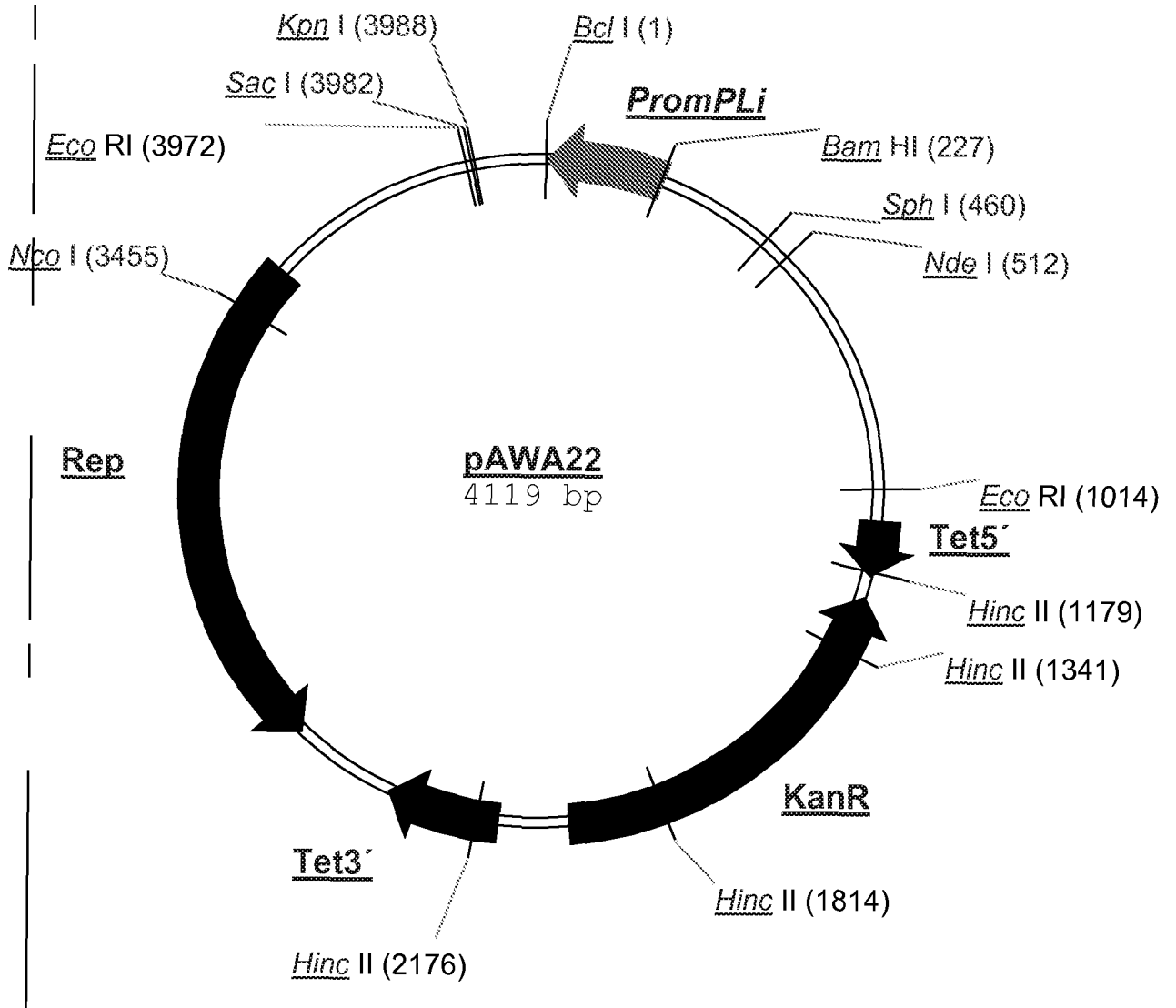
141 210

1 TSR GVLVIAA TGNNNGSGVG YPARYANAMA VGATDQNNRR ANFSQYGTGI DIVAPGVNVQ STYPGNRYAS
 2 TSQGVLVIAA TGNNNGSGVG YPARYANAMA VGATDQNNRR ANFSQYGTGI DIVAPGVNVQ STYPGNRYAS
 2 TSQGVLVIAA TGNNNGSGVG YPARYANAMA VGATDQNNRR ANFSQYGTGI DIVAPGVNVQ STYPGNRYAS
 3 TSRGVLVIAA TGNNGTGSIG YPARYAN AMA VGATDQNNRR ASFSQYGTGI DIVAPGVGIQ STYLNNSYAS

211 270

1 LNGTSMATPH VAGV AALVKQ RNPSWNATQI RNHLKNTATN LGNSSQFGSG LVNAEAAIR
 2 LNGTSMATPH VAGAAALVKQ RNPSWNATQI RNHLKNTATN LGNSSQFGSG LVNAEAAIR
 2 LNGTSMATPH VAGAAALVKQ RYPSWNATQI RNHLKNTATN LGNSSQFGSG LVNAEAAIR
 3 MPGTSMATPH VAGVAALVKQ KNPSWNATQI RNHLKNTATN LGNSSQFGSG LVNADAATR

Figur 2



PCT

Ausdruck (Original in elektronischem Format)
(Dieses Blatt zählt nicht als Blatt der internationalen Anmeldung und ist nicht Teil derselben)

0-1	Formular PCT/RO/134 (SAFE) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material	
0-1-1	erstellt mit	PCT Online Filing Version 3.5.000.193 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-2	Internationales Aktenzeichen	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	H 07394 Kst:6400610001
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	6
1-2	Zeile	5
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	05. Januar 2007 (05.01.2007)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 18912
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	EP: (AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE SI SK TR)AT AU BG CA CH&LI CZ DE DK EE ES FI GB HU IS LT LU PL PT RO SE SK TR

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der interna- tionalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	<input checked="" type="checkbox"/>
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	Van der Meer, Sandra

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/063346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/54 C12N15/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/054185 A (HENKEL KGAA [DE]; WEBER ANGRIT [DE]; HELLEBRANDT ANGELA [DE]; SCHMITZ) 3 July 2003 (2003-07-03) s. gesamtes Dokument	1-54
Y	WO 03/054184 A (HENKEL KGAA [DE]; WEBER ANGRIT [DE]; HELLEBRANDT ANGELA [DE]; SCHMITZ) 3 July 2003 (2003-07-03) s. gesamtes Dokument	1-54
P,Y	DE 10 2006 022216 A1 (HENKEL KGAA [DE]) 15 November 2007 (2007-11-15) s. gesamtes Dokument	1-54



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 Mai 2008

Date of mailing of the international search report

02/06/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Grosskopf, Ruediger

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/063346

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03054185 A	03-07-2003	AU 2002361400 A1	09-07-2003
		CN 1606619 A	13-04-2005
		DE 10162727 A1	10-07-2003
		EP 1456367 A1	15-09-2004
		HU 0402539 A2	28-04-2005
		JP 2005534280 T	17-11-2005
		US 2005003504 A1	06-01-2005

WO 03054184 A	03-07-2003	AU 2002358125 A1	09-07-2003
		CN 1606618 A	13-04-2005
		DE 10162728 A1	10-07-2003
		EP 1456366 A1	15-09-2004
		HU 0402430 A2	28-02-2005
		JP 2005512567 T	12-05-2005
		US 2005113273 A1	26-05-2005

DE 102006022216 A1	15-11-2007	WO 2007131657 A2	22-11-2007

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/063346

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C12N9/54 C12N15/31

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C12N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
 EPO-Internal, WPI Data, EMBL

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 03/054185 A (HENKEL KGAA [DE]; WEBER ANGRIT [DE]; HELLEBRANDT ANGELA [DE]; SCHMITZ) 3. Juli 2003 (2003-07-03) s. gesamtes Dokument	1-54
Y	WO 03/054184 A (HENKEL KGAA [DE]; WEBER ANGRIT [DE]; HELLEBRANDT ANGELA [DE]; SCHMITZ) 3. Juli 2003 (2003-07-03) s. gesamtes Dokument	1-54
P,Y	DE 10 2006 022216 A1 (HENKEL KGAA [DE]) 15. November 2007 (2007-11-15) s. gesamtes Dokument	1-54

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist | <ul style="list-style-type: none"> *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist |
|---|--|

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
23. Mai 2008	02/06/2008

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Grosskopf, Ruediger
---	--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/063346

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03054185 A	03-07-2003	AU 2002361400 A1	09-07-2003
		CN 1606619 A	13-04-2005
		DE 10162727 A1	10-07-2003
		EP 1456367 A1	15-09-2004
		HU 0402539 A2	28-04-2005
		JP 2005534280 T	17-11-2005
		US 2005003504 A1	06-01-2005
WO 03054184 A	03-07-2003	AU 2002358125 A1	09-07-2003
		CN 1606618 A	13-04-2005
		DE 10162728 A1	10-07-2003
		EP 1456366 A1	15-09-2004
		HU 0402430 A2	28-02-2005
		JP 2005512567 T	12-05-2005
		US 2005113273 A1	26-05-2005
DE 102006022216 A1	15-11-2007	WO 2007131657 A2	22-11-2007