



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2007 044 415 A1 2009.03.19**

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 044 415.1**

(22) Anmeldetag: **17.09.2007**

(43) Offenlegungstag: **19.03.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/54 (2006.01)**

C12N 15/57 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

(71) Anmelder:

Henkel AG & Co. KGaA, 40589 Düsseldorf, DE

(72) Erfinder:

Siegert, Petra, Dr., 42781 Haan, DE; Wieland, Susanne, Dr., 41541 Dormagen, DE; Weber, Angrit, 53567 Buchholz, DE; Maurer, Karl-Heinz, Dr., 40699 Erkrath, DE; Bessler, Cornelius, Dr., 40597 Düsseldorf, DE; Merkel, Marion, 52076 Aachen, DE; Evers, Stefan, 40822 Mettmann, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Leistungsverbesserte Proteasen und Wasch- und Reinigungsmittel enthaltend diese Proteasen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Anmeldung betrifft Proteasen, deren proteolytische Leistung durch Veränderung der Aminosäuresequenz insbesondere im Hinblick auf deren Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln verbessert wurde, alle hinreichend ähnlichen Proteasen mit einer vergleichbaren Veränderung und Nukleinsäuren sowie technische Einsatzmöglichkeiten für diese Proteasen, vor allem ihren Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln.

```

1
70
SEQ ID NO. 2 (1) QQTFFWQITFVQAPTFRBRCITGSGVYKVALLETQIAQSDLTIRGASPVFGRSTABLNGHRTFVAGTV
BLAP (1) AQGVFWQISRWQAFAMNRLTGSQVYKVALLETQISTHPELIRGASPVFGRSTQDQNGHRTFVAGTTI
Subtilisin 309 (269) (1) AQGVFWQISRWQAFAMNRLTGSQVYKVALLETQISTHPELIRGASPVFGRSTQDQNGHRTFVAGTTI

71
140
SEQ ID NO. 2 (71) AALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLSNANTNMHTAANSLSGDAPSTTLERAVNYA
BLAP (71) AALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLSNAGNRMHVANLSLGSPPSATLEQAVNSA
Subtilisin 309 (269) (71) AALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLSNAGNRMHVANLSLGSPPSATLEQAVNSA

141
210
SEQ ID NO. 2 (141) TSEGVLYVAAGNSGAGSISYFARYANAVGATDQNNRASFSQVQGLDIPVPGVQISTYLNHYAS
BLAP (141) TSEGVLYVAAGNSGAGSISYFARYANAVGATDQNNRASFSQVQAGLDIPVPGVQISTYLNHYAS
Subtilisin 309 (269) (141) TSEGVLYVAAGNSGAGSISYFARYANAVGATDQNNRASFSQVQAGLDIPVPGVQISTYLNHYAS

211
269
SEQ ID NO. 2 (211) MFGTSMATHRVAGAAALVQKRFPSMNVQIRMLKNTATSLGSLNLYSSGLWNAABAATR
BLAP (211) LMGTSMAATHRVAGAAALVQKRFPSMNVQIRMLKNTATSLGSLNLYSSGLWNAABAATR
Subtilisin 309 (269) (211) LMGTSMAATHRVAGAAALVQKRFPSMNVQIRMLKNTATSLGSLNLYSSGLWNAABAATR

```

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Anmeldung betrifft Proteasen, deren proteolytische Leistung durch Veränderung der Aminosäuresequenz insbesondere im Hinblick auf deren Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln verbessert wurde, alle hinreichend ähnlichen Proteasen mit einer vergleichbaren Veränderung und Nukleinsäuren sowie technische Einsatzmöglichkeiten für diese Proteasen, vor allem ihren Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln.

[0002] Proteasen gehören zu den technisch bedeutendsten Enzymen überhaupt. Hierunter sind wiederum Proteasen vom Subtilisin-Typ (Subtilasen, Subtilopeptidasen, EC 3.4.21.62) besonders wichtig, welche aufgrund der katalytisch wirksamen Aminosäuren den Serin-Proteasen zugerechnet werden. 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. Subtilasen werden natürlicherweise von Mikroorganismen gebildet; hierunter sind insbesondere die von *Bacillus*-Spezies gebildeten und sekretierten Subtilisine als bedeutendste Gruppe innerhalb der Subtilasen zu erwähnen.

[0003] Proteasen sind neben anderen Enzymen etablierte aktive Inhaltsstoffe von Wasch- und Reinigungsmitteln. Sie bewirken dabei den Abbau proteinhaltiger Anschmutzungen auf dem Reinigungsgut. Günstigenfalls ergeben sich Synergieeffekte zwischen den Enzymen und den übrigen Bestandteilen der betreffenden Mittel. Unter den Wasch- und Reinigungsmittelproteasen nehmen Subtilasen aufgrund ihrer günstigen enzymatischen Eigenschaften wie Stabilität oder pH-Optimum eine herausragende Stellung ein. Sie eignen sich daneben noch für eine Vielzahl weiterer technischer Verwendungsmöglichkeiten, beispielsweise als Bestandteile von Kosmetika oder in der organisch-chemischen Synthese. Hinsichtlich der Anwendung von Proteasen in Wasch- und Reinigungsmitteln ist bekannt, dass Proteasen zur Verbesserung der Wasch- beziehungsweise Reinigungsleistung zusammen mit weiteren Enzymen, beispielsweise Amylasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Mannanasen, β -Glucosidasen, Oxidasen, Oxidoreduktasen oder 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.

[0004] Beispiele für die in Wasch- und Reinigungsmitteln bevorzugt eingesetzten Proteasen vom Subtilisin-Typ sind die Subtilisine BPN' und Carlsberg, die Protease P692, die Subtilisine 147 und 309, die Alkalische Protease aus *Bacillus lentus*, Subtilisin DY und die den Subtilasen, nicht mehr jedoch den Subtilisinen im engeren Sinne zuzuordnenden Enzyme Thermitase, Proteinase K und die Proteasen TW3 und TW7.

[0005] Proteasen werden durch aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren gezielt oder zufallsbasiert verändert und so beispielsweise für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln optimiert. Dazu gehören Punktmutagenese, Deletions- oder Insertionsmutagenese oder Fusion mit anderen Proteinen oder Proteinteilen oder über sonstige Modifikationen. So sind für die meisten aus dem Stand der Technik bekannten Proteasen entsprechend optimierte Varianten bekannt.

[0006] 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 internationale Patentanmeldung WO 95/07991 A2 offenbart beispielsweise Doppelmutanten, in welchen die Aminosäure in Position 217 zu 15 anderen Aminosäuren, darunter auch zu L mutiert ist. Waschmittel mit derartigen BPN'-Varianten werden in der Patentanmeldung WO 95/29979 A1 offenbart.

[0007] Subtilisin Carlsberg ist in weiterentwickelter Form unter dem Handelsnamen Alcalase[®] von der Firma Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark, erhältlich. Sie 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 beschrieben und wird natürlicherweise von *Bacillus licheniformis* gebildet. Durch Punktmutationen in den Loop-Regionen dieses Moleküls erhältliche Varianten sind aus der Anmeldung WO 96/28566 A2 bekannt.

[0008] Die Protease PB92 wird natürlicherweise von dem alkaliphilen Bakterium *Bacillus nov. spec. 92* produziert und war unter dem Handelsnamen Maxacal[®] von der Fa. Gist-Brocades, Delft, Niederlande, erhältlich. In ihrer ursprünglichen Sequenz wird sie in der Patentanmeldung EP 283075 A2 beschrieben. Durch Punktmu-

tation erhaltene Varianten dieses Enzyms für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln werden beispielsweise in den Anmeldungen WO 94/02618 A1 und EP 328229 A1 offenbart. Aus beiden gehen Austausch in der Position 211 hervor, beispielsweise L211E beziehungsweise 1211Y, aber nur allein oder in Kombination mit anderen, hier nicht relevanten Punktmutationen.

[0009] 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 A offenbart werden. Durch Punktmutagenese in Hinblick auf den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln weiterentwickelte Varianten dieser Enzyme werden beispielsweise in den Anmeldungen WO 94/02618 A1 (siehe oben) und WO 95/30011 A2 offenbart. Aus WO 95/30011 A2 gehen Mutationen in den Loop-Regionen dieser Protease, unter anderem an Position 211, hervor.

[0010] 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. Aus der Anmeldung WO 95/23221 A1 beziehungsweise den zugehörigen US-Patenten US 5691295, US 5801039 und US 5855625 gehen darüber hinaus für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln durch gezielte Punktmutagenese leistungsverbesserte B. lentus-Alkalische Protease-Varianten hervor. Als ein relevanter Austausch gegenüber dem Wildtyp-Enzym aus B. lentus DSM 5483 ist ebenfalls die Position 211 genannt, insbesondere 211D und 211E. Die zugehörige Strategie, nämlich gezielt die Ladungsverhältnisse nahe der Substrat-Bindungstasche zu verändern, verdeutlicht das Patent US 6197589 B1.

[0011] Weitere Proteasen sind beispielsweise die unter den Handelsnamen Durazym[®], Relase[®], Everlase[®], Nafizym, Natalase[®], Kannase[®], Shinezyme[®] und Ovozyme[®] von der Firma Novozymes, die unter den Handelsnamen, Purafect[®], Purafect[®] OxP, Purafect[®] Prime und Properase[®] von der Firma Genencor, das unter dem Handelsnamen Protosol[®] von der Firma Advanced Biochemicals Ltd., Thane, Indien, das unter dem Handelsnamen PRODET P von der Firma Richcore India, Bangalore, 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.

[0012] Eine Besonderheit stellen die in der internationalen Patentanmeldung WO 03/054185 offenbarten alkalischen Proteasen aus Bacillus gibsonii (DSM 14391) dar. Dieser Stamm ist gemäß dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen vom 28. April 1977 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (<http://www.dsmz.de>) unter der Bezeichnung ID 01-192 und der Eingangsnummer DSM 14391 hinterlegt. Gegenüber den vorstehend genannten Proteasen weisen diese Proteasen erhebliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf, so dass ein Identitätsvergleich der Aminosäuresequenzen Identitätswerte ergibt, die unter 80% Identität liegen. Nachfolgende Tabelle 1 verdeutlicht diesen Sachverhalt an konkreten Beispielen:

Tabelle 1:

Protease	Identität zur alkalischen Proteasen aus Bacillus gibsonii DSM 14391 (in %)
Subtilisin 309	78,4
Alkalische Protease aus Bacillus lentus DSM 5483	77,7
BPN'	55,3
PB92	78,1

[0013] Für die alkalischen Proteasen aus Bacillus gibsonii (DSM 14391) sind keine für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln leistungsverbesserte Protease-Varianten im Stand der Technik bekannt, insbesondere keine Varianten, die eine Veränderung an den Positionen 211 und/oder 212 in der Zählweise der alkalischen Proteasen aus Bacillus gibsonii (DSM 14391), bezogen auf das reife Enzym, aufweisen.

[0014] Die in erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzten Proteasen stammen entweder ursprünglich aus Mikroorganismen, beispielsweise aus Mikroorganismen der Gattungen Bacillus, Streptomyces, Humicola, oder Pseudomonas, und/oder werden nach an sich bekannten biotechnologischen Verfahren durch geeignete Mikroorganismen produziert, beispielsweise durch transgene Expressionswirte der Gattungen Bacillus oder

durch filamentöse Fungi. Letzteres gilt insbesondere für Protease-Varianten, die ausgehend von einem Ausgangsmolekül verändert wurden und somit beispielsweise für deren Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln optimiert wurden.

[0015] 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.

[0016] Es besteht nach wie vor ein hoher Bedarf an Proteasen in diversen technischen Einsatzgebieten. Insbesondere hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in Wasch- und Reinigungsmitteln besteht selbst für die im Stand der Technik etablierte Familie der Subtilisin-Proteasen nach wie vor ein Optimierungsbedarf betreffend beispielsweise deren katalytische Aktivität, die Reaktionsbedingungen, die Stabilität oder die Substratspezifität. Gerade hinsichtlich der Verwendung einer Protease in Wasch- und Reinigungsmitteln ist es jedoch in der Regel nicht möglich, auf Grund der mess- oder kalkulierbaren enzymatischen Eigenschaften des Enzyms per se auf dessen Verhalten in Wasch- oder Reinigungsmittelrezepturen zu schließen. Diesbezüglich spielen weitere Faktoren wie Stabilität gegenüber oxidierenden Agentien, Denaturierung durch Tenside, Faltungseffekte oder Synergien mit anderen Inhaltsstoffen eine Rolle, die das Verhalten des Enzyms bzw. der Enzyme in Wasch- oder Reinigungsmitteln bzw. in den resultierenden Wasch- bzw. Reinigungslösungen beeinflussen.

[0017] Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine alkalische Protease vom Typ der alkalischen Proteasen aus *Bacillus gibsonii* DSM 14391 weiterzuentwickeln und leistungsverbesserte Varianten zu erhalten, die in technischen Anwendungen verbesserte Leistungen zeigen. Insbesondere sollten solche gefunden werden, deren Leistungsverbesserung eine gesteigerte Reinigungsleistung von Wasch- und/oder Reinigungsmitteln bewirkt. Diesbezüglich sollten solche Protease-Varianten erzeugt werden, die in Bezug auf die Ausgangsprotease eine verbesserte Waschleistung in Bezug auf zumindest eine Anschmutzung, vorzugsweise in Bezug auf mehrere Anschmutzungen, aufweisen.

[0018] 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.

[0019] Eine 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 aufweisen.

[0020] 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.

[0021] Eine Lösung für die vorstehend genannte Aufgabe ergibt sich erfindungsgemäß aus der Lehre des ersten Anspruchs. Einen Gegenstand der Erfindung bildet somit eine Protease, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 78,5% identisch ist, und die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 oder Position 212 oder an den Positionen 211 und 212 eine im Vergleich zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäure veränderte Aminosäure aufweist.

[0022] Überraschenderweise wurde festgestellt, dass eine Veränderung der Positionen 211 und/oder 212 in einer Protease, die eine zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 78,5% identische Aminosäuresequenz umfasst, eine verbesserte Leistung dieser veränderten Protease in Wasch- und Reinigungsmitteln bewirkt im Vergleich zu einer entsprechenden Protease, die diese Veränderungen nicht aufweist. Dies ist insbesondere deshalb überraschend, da sich die erfindungsgemäß veränderte Protease wie vorstehend beschrieben von weiteren Subtilisinen – wie beispielsweise Subtilisin 309, PB92, der alkalische Protease aus *Bacillus lentus* DSM 5483, BPN', Proteinase K-16, etc. – deutlich unterscheidet. Es war somit keinesfalls zu erwarten, dass für alkalische Proteasen aus *Bacillus gibsonii* (DSM 14391) für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln leistungsverbesserte Protease-Varianten erhalten werden durch eine Verände-

rung an den Positionen 211 und/oder 212 in der Zählweise der alkalischen Proteasen aus *Bacillus gibsonii* (DSM 14391), bezogen auf das reife Enzym. Unerwarteterweise führen genau diese Veränderungen bei diesen Enzymen zu einer Leistungsverbesserung, die sich von den klassischen, etablierten Proteasen vom Subtilisin-Typ unterscheiden.

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Protease dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zunehmend bevorzugt zu mindestens 80%, 82,5%, 85%, 87,5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 99,25% identisch ist.

[0024] Überraschenderweise wurde ferner festgestellt, dass mehrere Möglichkeiten vorhanden sind, die vorhandene Aminosäure in den Positionen 211 und/oder 212 zu verändern, um eine Leistungsverbesserung der resultierenden Protease zu erhalten. Grundsätzlich ist es von Bedeutung, dass die Protease an einer dieser Positionen überhaupt verändert ist, d. h. die an der jeweiligen Position vorhandene Aminosäure durch eine andere proteinogene Aminosäure ersetzt ist. Alternativ können auch beide Positionen derart verändert sein. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung bildet daher eine Protease, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Protease ausgewählt ist aus

- a) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 eine Aminosäure aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin
- b) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 212 eine Aminosäure aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin
- c) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 eine Aminosäure gemäß Merkmal a) aufweist und an Position 212 eine Aminosäure gemäß Merkmal b) aufweist.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist Protease dadurch gekennzeichnet, dass die Protease ausgewählt ist aus

- a) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 einen Serinrest aufweist
- b) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 212 einen Asparaginrest aufweist
- c) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 einen Serinrest und an Position 212 einen Asparaginrest aufweist.

[0026] Denn für die vorstehend genannten Substitutionen wurde eine besonders vorteilhafte Leistungsverbesserung festgestellt bei einem Einsatz dieser Protease-Varianten in Wasch- und Reinigungsmitteln, insbesondere in Waschmittelformulierungen. Ausgehend und in der Zählweise von SEQ ID NO. 2 weisen die erfindungsgemäßen Varianten daher die Aminosäureveränderungen M211S (die Aminosäure Methionin an Position 211 wurde ersetzt durch die Aminosäure Serin) beziehungsweise P212N (die Aminosäure Prolin an Position 212 wurde ersetzt durch die Aminosäure Asparagin) alleine oder in Kombination auf.

[0027] Zusätzlich zu den vorstehend erläuterten Aminosäureveränderungen können erfindungsgemäße Proteasen weitere Aminosäureveränderungen, insbesondere Aminosäure-Substitutionen, -Insertionen oder -Deletionen, aufweisen.

[0028] Mit allen vorstehend genannten Erfindungsgegenständen sind als weitere Erfindungsgegenstände die zugehörigen Nukleinsäuren, entsprechende natürliche Zellen, geeignete Verfahren zu ihrer Identifizierung, insbesondere auf den Nukleinsäuren aufbauende molekularbiologische Verfahren und Verfahrenselemente sowie Mittel, Wasch- und Reinigungsmittel, Wasch- und Reinigungsverfahren und über die betreffenden Proteasen gekennzeichnete Verwendungsmöglichkeiten verbunden. Aufgrund der zur Verfügung gestellten Nukleinsäuren ist eine zusätzliche Optimierung dieses Enzyms, beispielsweise über weitere Punktmutationen möglich. Ferner kann diese DNA in Shuffling-Ansätze eingebracht und damit zur Erzeugung völlig neuartiger Proteasen genutzt werden.

[0029] Unter einem Enzym ist im Sinne der vorliegenden Anmeldung ein Protein zu verstehen, das eine bestimmte biokatalytische Funktion ausübt. Unter Protease im Sinne der vorliegenden Anmeldung wird ein Enzym verstanden, welches die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysiert und dadurch in der Lage ist, Peptide oder Proteine zu spalten.

[0030] Ein Protein ist im Sinne der vorliegenden Anmeldung ein aus den natürlichen Aminosäuren zusammengesetztes, weitgehend linear aufgebautes, zur Ausübung seiner Funktion zumeist eine dreidimensionale Struktur annehmendes Polypeptid. Ein Peptid besteht aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander kovalent verbunden sind. Die Bezeichnung Polypeptid verdeutlicht diesbezüglich den Sachverhalt, dass diese Peptidkette in der Regel aus vielen Aminosäuren besteht, die über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Aminosäuren können in einer L- und einer D-Konfiguration vorliegen, wobei die Aminosäuren, aus denen Proteine bestehen, in der L-Konfiguration vorliegen. Sie werden als proteinogene Aminosäuren bezeichnet. In der vorliegenden Anmeldung werden die proteinogenen, natürlich vorkommenden L-Aminosäuren mit den international gebräuchlichen 1- und 3-Buchstaben-Codes bezeichnet. Zahlreiche Proteine werden als sogenannte Präproteine, also zusammen mit einem Signalpeptid gebildet. Darunter ist dann der N-terminale Teil des Proteins zu verstehen, dessen Funktion zumeist darin besteht, die Ausschleusung des gebildeten Proteins aus der produzierenden Zelle in das Periplasma oder das umgebende Medium und/oder dessen korrekte Faltung zu gewährleisten. Anschließend wird das Signalpeptid unter natürlichen Bedingungen durch eine Signalpeptidase vom übrigen Protein abgespalten, so dass dieses seine eigentliche katalytische Aktivität ohne die zunächst vorhandenen N-terminalen Aminosäuren ausübt. Pro-Proteine sind inaktive Vorstufen von Proteinen. Deren Vorläufer mit Signalsequenz werden als Prä-Pro-Proteine bezeichnet. Für technische Anwendungen sind aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität die maturen, d. h. reifen Peptide, d. h. die nach ihrer Herstellung prozessierten Enzyme gegenüber den Präproteinen bevorzugt. Die Proteine können von den sie produzierenden Zellen nach der Herstellung der Polypeptidkette modifiziert werden, beispielsweise durch Anknüpfung von Zuckermolekülen, Formylierungen, Aminierungen, usw. Solche Modifikationen werden als posttranslationale Modifikationen bezeichnet. Diese posttranslationalen Modifizierungen können, müssen jedoch nicht einen Einfluss auf die Funktion des Proteins ausüben.

[0031] Im Sinne der vorliegenden Erfindung werden alle Enzyme, Proteine, Fragmente und Derivate, sofern sie nicht explizit als solche angesprochen zu werden brauchen, unter dem Oberbegriff Proteine zusammengefasst.

[0032] Durch Vergleich mit bekannten Enzymen, die beispielsweise in allgemein zugänglichen Datenbanken hinterlegt sind, lässt sich aus der Aminosäure- oder Nukleotid-Sequenz die enzymatische Aktivität eines betrachteten Enzyms folgern. Diese kann durch andere Bereiche des Proteins, die nicht an der eigentlichen Reaktion beteiligt sind, qualitativ oder quantitativ modifiziert werden. Dies könnte beispielsweise die Enzymstabilität, die Aktivität, die Reaktionsbedingungen oder die Substratspezifität betreffen.

[0033] Solch ein Vergleich geschieht dadurch, dass ähnliche Abfolgen in den Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen der betrachteten Proteine einander zugeordnet werden. Dies nennt man Homologisierung. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Bei der Analyse von Nukleotidsequenzen sind wiederum beide komplementären Stränge und jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen; ebenso die Degeneriertheit des genetischen Codes und die organismenspezifische Verwendung der Codons (Codon-Usage). Inzwischen werden Alignments über Computerprogramme erstellt, wie beispielsweise durch die Algorithmen FASTA oder BLAST; dieses Vorgehen wird beispielsweise von D. J. Lipman und W. R. Pearson (1985) in Science, Band 227, S. 1435–1441 beschrieben.

[0034] Eine Zusammenstellung aller in den verglichenen Sequenzen übereinstimmenden Positionen wird als Konsensus-Sequenz bezeichnet.

[0035] Solch ein Vergleich erlaubt auch eine Aussage über die Ähnlichkeit oder Homologie der verglichenen Sequenzen zueinander. Diese wird in Prozent Identität, das heißt dem Anteil der identischen Nukleotide oder Aminosäurereste an denselben bzw. in einem Alignment einander entsprechenden Positionen wiedergegeben. Ein weiter gefaßter Homologiebegriff bezieht die konservierten Aminosäure-Austausche in diesen Wert mit ein. Es ist dann von Prozent Ähnlichkeit die Rede. Solche Aussagen können über ganze Proteine oder Gene oder nur über einzelne Bereiche getroffen werden.

[0036] Homologe Bereiche von verschiedenen Proteinen sind durch Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz definiert. Diese können auch durch identische Funktion gekennzeichnet sein. Sie geht bis zu völligen Identitäten in kleinsten Bereichen, sogenannten Boxen, die nur wenige Aminosäuren umfassen und meist für die Gesamtaktivität essentielle Funktionen ausüben. Unter den Funktionen der homologen Bereiche sind kleinste Teilfunktionen der vom gesamten Protein ausgeübten Funktion zu verstehen, wie beispielsweise die Ausbildung einzelner Wasserstoffbrückenbindungen zur Komplexierung eines Substrats oder Übergangskomplexes.

[0037] Proteine können auch über die Reaktion mit einem Antiserum oder einem bestimmten Antikörper zu Gruppen immunologisch verwandter Proteine zusammengefaßt werden. Die Angehörigen einer Gruppe zeichnen sich dadurch aus, dass sie dieselbe, von einem Antikörper erkannte antigene Determinante aufweisen.

[0038] Einen weiteren Erfindungsgegenstand bilden daher Proteasen, dadurch gekennzeichnet sind, dass sie mindestens eine und zunehmend bevorzugt zwei, drei oder vier übereinstimmende antigene Determinanten mit einer erfindungsgemäßen Protease aufweisen.

[0039] Proteasen bzw. Enzyme im allgemeinen können durch verschiedene Verfahren, z. B. gezielte genetische Veränderung durch Mutageneseverfahren, weiterentwickelt und für bestimmte Einsatzzwecke oder hinsichtlich spezieller Eigenschaften, beispielsweise katalytische Aktivität, Stabilität, usw., optimiert werden. Änderungen der Nukleotidsequenz, wie sie beispielsweise durch an sich bekannte molekularbiologische Methoden herbeigeführt werden können, werden demnach als Mutationen bezeichnet. Je nach Art der Änderung kennt man beispielsweise Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutationen oder solche, bei denen verschiedene Gene oder Teile von Genen miteinander fusioniert (shuffling) werden; dies sind Genmutationen. Die zugehörigen Organismen werden als Mutanten bezeichnet. Die von mutierten Nukleinsäuren abgeleiteten Proteine werden als Varianten bezeichnet. So führen beispielsweise Deletions-, Insertions-, Substitutionsmutationen oder Fusionen zu deletions-, insertions-, substitutionsmutierten oder Fusionsgenen und auf Proteinebene zu entsprechenden Deletions-, Insertions- oder Substitutionsvarianten, beziehungsweise Fusionsproteinen. Die Strategie, in die bekannten Moleküle gezielte Punktmutationen einzuführen, etwa um die Waschleistung der Proteasen, beispielsweise Subtilisinen, zu verbessern, wird auch als Rationales Protein-Design bezeichnet. Eine ähnliche Strategie der Leistungsverbesserung besteht darin, die Oberflächenladungen und/oder den isoelektrischen Punkt der Moleküle und darüber ihre Wechselwirkungen mit dem Substrat zu verändern. So kann beispielsweise über Punktmutationen die Nettoladung der Subtilisine verändert werden, um darüber die Substratbindung insbesondere für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln zu beeinflussen. Eine weitere, insbesondere ergänzende Strategie besteht darin, die Stabilität der betreffenden Proteasen zu erhöhen und damit ihre Wirksamkeit zu erhöhen, beispielsweise über Kopplung an ein oder mehrere gleichartige oder verschiedenartige Polymere. Insbesondere für kosmetische Anwendungen kann eine solche Kopplung in einer verbesserten Hautverträglichkeit resultieren. Insbesondere für Wasch- und Reinigungsmittel sind zwar Stabilisierungen durch Punktmutationen geläufiger, entsprechende Kopplungen an Polymere aber dennoch möglich.

[0040] Eine moderne Richtung der Enzymentwicklung besteht darin, Elemente aus bekannten, miteinander verwandten Proteinen über statistische Verfahren zu neuen Enzymen mit bislang nicht erreichten Eigenschaften zu kombinieren. Solche Verfahren werden auch unter dem Oberbegriff Directed Evolution 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 RACHITT (Coco, W. M. et al. (2001), Nat. Biotechnol., Band 19, S. 354–359). Eine weitere Shuffling-Methode mit der Bezeichnung „Recombining ligation reaction“ (RLR) ist in WO 00/09679 A1 beschrieben.

[0041] Für die Beschreibung von Punktmutationen, die genau eine Aminosäureposition betreffen (Aminosäureaustausche), wird folgende Konvention angewendet: zunächst wird die natürlicherweise vorhandene Aminosäure in Form des international gebräuchlichen Einbuchstaben-Codes bezeichnet, dann folgt die zugehörige Sequenzposition und schließlich die eingefügte Aminosäure. Mehrere Austausche innerhalb derselben Polypeptidkette werden durch Schrägstriche voneinander getrennt.

[0042] Es ist aus dem Stand der Technik weiterhin allgemein bekannt, dass sich vorteilhafte Eigenschaften einzelner Mutationen, z. B. einzelner Punktmutationen, ergänzen können. Eine hinsichtlich bestimmter Eigenschaften bereits optimierte Protease, zum Beispiel hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber Tensiden oder anderen Komponenten, kann erfindungsgemäß zusätzlich weiterentwickelt werden.

[0043] Unter Fragmenten werden alle Proteine oder Peptide verstanden, die kleiner sind als natürliche Proteine und beispielsweise auch synthetisch erhalten werden können. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen können sie den betreffenden vollständigen Proteinen zugeordnet werden. Sie können beispielsweise gleiche Strukturen annehmen oder proteolytische Aktivitäten oder Teilaktivitäten ausüben, wie beispielsweise die Komplexierung eines Substrats. Fragmente und Deletionsvarianten von Ausgangsproteinen sind prinzipiell gleichartig; während Fragmente eher kleinere Bruchstücke darstellen, fehlen den Deletionsmutanten eher nur kurze Bereiche, und damit nur einzelne Teilfunktionen.

[0044] Unter chimären oder hybriden Proteinen sind im Sinne der vorliegenden Anmeldung solche Proteine

zu verstehen, deren Sequenz die Sequenzen oder Teilsequenzen von mindestens zwei Ausgangsproteinen umfasst. Die Ausgangsproteine können diesbezüglich aus verschiedenen oder aus demselben Organismus stammen. Chimäre oder hybride Proteine können beispielsweise durch Rekombinationsmutagenese erhalten werden. Der Sinn einer solchen Rekombination kann beispielsweise darin bestehen, mithilfe des heranzufusionierten Proteinteils eine bestimmte enzymatische Funktion herbeizuführen 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, auf welche sich unterschiedliche Funktionen verteilen können.

[0045] Unter durch Insertionsmutation erhaltene Proteine sind solche Varianten zu verstehen, die durch Einfügen eines Proteinfragments in die Ausgangssequenzen erhalten worden sind. Sie sind ihrer prinzipiellen Gleichartigkeit wegen den chimären Proteinen zuzuordnen. Sie unterscheiden sich von jenen lediglich im Größenverhältnis des unveränderten Proteinteils zur Größe des gesamten Proteins. In solchen insertionsmutierten Proteinen ist der Anteil an Fremdprotein geringer als in chimären Proteinen.

[0046] Inversionsmutagenese, also eine partielle Sequenzumkehrung, kann als Sonderform sowohl der Deletion, als auch der Insertion angesehen werden. Dasselbe gilt für eine von der ursprünglichen Aminosäureabfolge abweichende Neugruppierung verschiedener Molekülteile. Sie kann sowohl als Deletionsvariante, als Insertionsvariante, als auch als Shuffling-Variante des ursprünglichen Proteins angesehen werden.

[0047] Unter Derivaten werden im Sinne der vorliegenden Anmeldung solche Proteine verstanden, deren reine Aminosäurekette chemisch modifiziert worden ist. Solche Derivatisierungen können beispielsweise biologisch im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese durch die Wirtszelle erfolgen. Hierfür können molekularbiologische Methoden eingesetzt werden. Sie können aber auch chemisch durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette einer Aminosäure oder durch kovalente Bindung einer anderen Verbindung an das Protein. Bei solch einer Verbindung kann es sich beispielsweise auch um andere Proteine handeln, die beispielsweise über bifunktionelle chemische Verbindungen an erfindungsgemäße Proteine gebunden werden. Derartige Modifizierungen können beispielsweise die Substratspezifität oder die Bindungsstärke an das Substrat beeinflussen oder eine vorübergehende Blockierung der enzymatischen Aktivität herbeiführen, wenn es sich bei der angekoppelten Substanz um einen Inhibitor handelt. Dies kann beispielsweise für den Zeitraum der Lagerung sinnvoll sein. Ebenso ist unter Derivatisierung die kovalente Bindung an einen makromolekularen Träger zu verstehen, genauso wie auch ein nichtkovalenter Einschluss in geeignete makromolekulare Käfigstrukturen.

[0048] Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt somit eine Protease dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie aus einer erfindungsgemäßen Protease als Ausgangsmolekül erhaltbar ist durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 266 und zunehmend bevorzugt mindestens 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60 und 50 zusammenhängenden Aminosäurepositionen mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt.

[0049] So ist es beispielsweise möglich, an den Termini oder in den Loops des Enzyms einzelne Aminosäuren zu deletieren, ohne daß dadurch die proteolytische Aktivität verlorengeht. Ferner kann durch derartige Deletionen die Allergenizität betreffender Proteasen gesenkt und somit insgesamt ihre Einsetzbarkeit verbessert werden kann. Die Fragmentierung kommt dem nachstehend ausgeführten Aspekt der Insertions- oder Substitutionsmutagenese und/oder auch einer möglichen 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.

[0050] Zahlreiche Dokumente des Stands der Technik offenbaren vorteilhafte Wirkungen von Insertionen und Substitutionen in Subtilasen. Prinzipiell gehören hierzu auch Einzelaustausche von Aminosäuren, es können aber auch mehrere zusammenhängende Aminosäuren gegen andere ausgetauscht werden. Hierzu gehören auch Neukombinationen von größeren Enzymabschnitten, d. h. die Kombination von Fragmenten, mit anderen Proteasen oder Proteinen anderer Funktion beziehungsweise wiederum Fragmenten derselben. So ist es beispielsweise 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.

[0051] Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt eine Protease dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie aus einer erfindungsgemäßen Protease als Ausgangsmolekül erhaltbar ist und einen oder mehrere Aminosäureaustausche in Positionen aufweist, die 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, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 und 268 der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* gemäß SEQ ID NO. 3 in einem Alignment zugeordnet sind. Die Aminosäurepositionen werden hierbei durch ein Alignment der Aminosäuresequenz einer erfindungsgemäßen Protease mit der Aminosäuresequenz der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus*, wie sie in SEQ ID NO. 3 angegeben ist, zugeordnet. Auf diese Art und Weise werden so genannte homologe Positionen bestimmt. Ein Beispiel für ein solches Alignment ist in [Fig. 1](#) angegeben.

[0052] Eine endgültige Bestätigung in der Zuordnung homologer Positionen, d. h. insbesondere deren funktionelle Entsprechung, können letztlich nur Vergleichsversuche liefern, wonach die beiden auf der Basis eines Alignments einander zugeordneten Positionen in beiden miteinander verglichenen Proteasen auf die gleiche Weise punktmutiert werden und beobachtet wird, ob bei beiden die enzymatische Aktivität auf gleiche Weise verändert wird. Geht beispielsweise ein Aminosäureaustausch in einer bestimmten Position der B. *lentus*-Alkalische Protease (BLAP) mit einer Erhöhung von KM oder einem anderen enzymatischen Parameter einher, und wird tendenziell die gleiche Verschiebung des KM-Werts in einer erfindungsgemäßen Protease-Variante beobachtet, deren Aminosäureaustausch durch dieselbe eingeführte Aminosäure erreicht wurde, so ist hierin die Bestätigung dieses Erfindungsaspekts zu sehen.

[0053] In den genannten Positionen liegen in dem Wildtypmolekül der B. *lentus*-Alkalischen Protease folgende Aminosäurereste: S3, V4, S36, N42, A47, T56, G61, T69, E87, A96, R99, A101, I102, S104, N114, H118, A120, S130, S139, T141, S142, S154, S157, A188, V193, V199, G205, A224, K229, S236, N237, N242, H243, N255 beziehungsweise T268.

[0054] Da neben der Alkalischen Protease aus *Bacillus licheniformis* die B. *lentus*-Alkalische Protease im Stand der Technik ein wichtiges Referenzmolekül zur Beschreibung neuer Proteasen und von Punktmutationen darstellt und die hier beschriebenen neuen Proteasen und somit auch ihre Sequenz bislang unbekannt sind, erscheint es vorteilhaft, in der Zuordnung der Punktmutationen auf die Zählung der Alkalische Protease aus *Bacillus lentus* Bezug zu nehmen. Weiterhin richtet sich die Zählung im Allgemeinen nach dem reifen (maturen) Protein. Vorteilhafte Positionen für Sequenzveränderungen, beispielsweise durch Punktmutationen, der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus*, die übertragen auf homologe Positionen der erfindungsgemäßen Proteasen bevorzugt von Bedeutung sind und der Protease vorteilhafte funktionelle Eigenschaften verleihen, werden nachfolgend angegeben.

[0055] Aus der Anmeldung WO 92/21760 A1 gehen Einfach- und Mehrfachvarianten des Subtilisins aus *Bacillus lentus* DSM 5483 in folgenden Positionen hervor: 3, 4, 36, 42, 47, 56, 69, 87, 96, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 157, 188, 193, 199, 205, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 und 268. Die Anmeldung WO 95/23221 A1 offenbart neben einer Veränderung der Position 211 zusätzlich Austausch an diesem Molekül in den Positionen 99 und 154, insbesondere R99G, R99A, R99S, S154D und S154E. Die Anmeldung WO 02/088340 offenbart neben einer möglichen Veränderung an Position 211 weitere mögliche Aminosäureaustausche in einer oder mehreren der Positionen 3, 4 und 199, wobei die Austausche an Position 3 (zum Beispiel S3T) und an Position 4 (zum Beispiel V4I) vermutlich über einen Stabilisierungseffekt auf das Molekül zu einer Verbesserung seines Beitrags zur Waschleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels führen.

[0056] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine zuvor beschriebene Protease, die zusätzlich stabilisiert ist, insbesondere durch Kopplung an ein Polymer.

[0057] Denn eine Erhöhung der Stabilität bei der Lagerung und/oder während des Einsatzes, beispielsweise beim Waschprozess führt dazu, daß ihre Aktivität länger anhält und damit in der Wirkung verstärkt wird. Als Stabilisierungsmöglichkeiten kommen alle im Stand der Technik beschriebenen und zweckmäßigen Strategien in Betracht, beispielsweise die kovalente Kopplung an ein Polymer. Alternativ hierzu sind auch solche Stabilisierungen geeignet, die über Punktmutagenese des Moleküls selbst möglich sind (und aufgrund der Sequenzunterschiede bereits unter die oben beschriebenen Ausführungsformen fallen). Denn diese Stabilisierungen erfordern im Anschluß an die Proteingewinnung keine weiteren Arbeitsschritte. Einige hierfür geeignete Punktmutationen sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt. So können Proteasen beispielsweise dadurch stabilisiert werden, dass ein oder mehrere Tyrosin-Reste gegen andere proteinogene Aminosäuren austauscht.

[0058] Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung von Enzymen stellt beispielsweise Veränderung der Bin-

derung von Metallionen, insbesondere der Bindung von Calcium-Ionen, durch Veränderung der entsprechenden Bindungsstellen, insbesondere der Calcium-Bindungsstellen, dar. Hierfür kann beispielsweise eine oder mehrere der an der Calcium-Bindung bzw. Metallionen-Bindung beteiligten Aminosäuren gegen negativ geladene Aminosäuren ausgetauscht werden. Alternativ oder zusätzlich können zur Stabilisierung über die Calcium-Bindung gleichzeitig in mindestens einer der Folgen der beiden Aminosäurereste Arginin/Glycin Punktmutationen eingeführt werden. Als eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung können Proteine durch Mutationen auf der Oberfläche des Proteins gegen den Einfluß von denaturierenden Agentien wie Tensiden, insbesondere ionischen Tensiden, geschützt werden. Insbesondere können hydrophobe Aminosäurereste durch stärker hydrophile Aminosäurereste ersetzt werden und/oder polare ungeladene Aminosäurereste durch sterisch anspruchsvollere Aminosäurereste, vor allem solche mit im Vergleich zur ursprünglich vorhandenen Aminosäure längeren hydrophilen Seitenketten, ersetzt werden und/oder ionische Aminosäuren ersetzt werden durch ungeladene hydrophile Aminosäurereste oder durch Aminosäurereste, deren Ladung nicht gegensätzlich zur Nettoladung des denaturierenden Agens, also beispielsweise des ionischen Tensids, ist.

[0059] Eine andere Möglichkeit zur Stabilisierung gegenüber erhöhter Temperatur und dem Einwirken von Tensiden ergibt sich durch den Austausch von Aminosäuren, die nahe des N-Terminus liegen, gegen solche Aminosäuren, die vermutlich über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Rest des Moleküls in Kontakt treten und somit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der globulären Struktur leisten.

[0060] Bevorzugte Ausführungsformen sind solche, bei denen das Molekül auf mehrere Arten stabilisiert wird. Denn in der Regel wirken mehrere stabilisierende Mutationen additiv oder synergistisch auf die Gesamtstabilität des Enzyms. Besonders bevorzugt sind daher Kombinationen von stabilisierenden Enzymveränderungen, die synergistisch zusammenwirken und sich in ihrer stabilisierenden Wirkung dahingehend ergänzen, dass die kombinatorisch erreichte Stabilisierung die bloße Summe der einzelnen Stabilisierungseffekte übersteigt.

[0061] Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt eine Protease wie vorstehend beschrieben dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie mindestens eine chemische Modifikation aufweist. Eine Protease mit einer solchen Veränderung wird auch als Derivat bezeichnet, d. h. die Protease ist derivatisiert.

[0062] Unter Derivaten werden daher solche Proteine verstanden, die durch eine zusätzliche Modifikation aus den ausgeführten Proteinen erhalten werden. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine chemische Modifikation der erfindungsgemäßen Proteine. 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.

[0063] Solche Derivatisierungen, insbesondere chemische Modifikationen, können beispielsweise auf biologischem Wege erfolgen, etwa im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese durch den produzierenden Wirtsorganismus. Hier sind Kopplungen niedrigmolekularer Verbindungen wie von Lipiden oder Oligosacchariden besonders hervorzuheben.

[0064] Derivatisierungen können aber auch auf chemischem Wege durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette oder durch kovalente Bindung einer anderen, beispielsweise makromolekularen Verbindung an das Protein. Beispielsweise kann die Kopplung von Aminen an Carboxylgruppen eines Enzyms eine Veränderung des isoelektrischen Punkts des Proteins bewirken. Ferner können beispielsweise weitere Makromoleküle wie Proteine, etwa über bifunktionelle chemische Verbindungen, an erfindungsgemäße Proteine gebunden werden. So ist es beispielsweise möglich, ein erfindungsgemäßes Protein auch über einen Nichtprotein-Linker mit einer spezifischen Bindungsdomäne zu versehen. Solche Derivate eignen sich besonders für den Einsatz in in Wasch- oder Reinigungsmitteln. Analog können beispielsweise 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 wie bereits vorstehend erläutert.

[0065] 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 unabhängig davon, ob es in einer bestimmten Präparation tatsächlich die vorgesehene 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 enzymatische Funktion entfaltet. Dies kann beispielsweise über entsprechende Begleitstoffe gesteuert werden. Insbesondere die gemeinsame Präparation von Proteasen mit Protease-Inhibitoren ist vorteilhaft und aus dem Stand der Technik bekannt.

[0066] Die Lösung einer Teilaufgabe und somit einen eigenständigen Erfindungsgegenstand bilden Nukleinsäuremoleküle, die für eine erfindungsgemäße Protease kodieren sowie Vektoren, enthaltend eine solche Nukleinsäure.

[0067] Unter Nukleinsäuren sind im Sinne der vorliegenden Anmeldung die natürlicherweise aus Nukleotiden aufgebauten als Informationsträger dienenden Moleküle zu verstehen, die für die lineare Aminosäureabfolge in Proteinen oder Enzymen codieren. Sie können als Einzelstrang, als ein zu diesem Einzelstrang komplementärer Einzelstrang oder als Doppelstrang vorliegen. Als der natürlicherweise dauerhaftere Informationsträger ist die Nukleinsäure DNA für molekularbiologische Arbeiten bevorzugt. Demgegenüber wird für die Realisierung der Erfindung in natürlicher Umgebung, wie beispielsweise in einer exprimierenden Zelle, eine RNA gebildet, weshalb erfindungswesentliche RNA-Moleküle ebenfalls Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellen.

[0068] Bei DNA sind die Sequenzen beider komplementärer Stränge in jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Codon-Triplets für dieselben Aminosäuren codieren können, so dass eine bestimmte Aminosäure-Abfolge von mehreren unterschiedlichen und möglicherweise nur geringe Identität aufweisenden Nukleotidsequenzen abgeleitet werden kann, was als Degeneriertheit des genetischen Codes bezeichnet wird. Außerdem weisen verschiedene Organismen Unterschiede im Gebrauch dieser Codons auf. Aus diesen Gründen müssen sowohl Aminosäuresequenzen als auch Nukleotidsequenzen in die Betrachtung des Schutzbereichs einbezogen werden. Daher sind sämtliche Nukleotidsequenzen in die Erfindung mit eingeschlossen, die eine der vorstehend beschriebenen Enzyme kodieren können. Der Fachmann ist in der Lage, diese Nukleotidsequenzen zweifelsfrei zu bestimmen, da trotz der Degeneriertheit des genetischen Codes einzelnen Codons definierte Aminosäuren zuzuordnen sind. Daher kann der Fachmann ausgehend von einer sind jeweils nur als eine beispielhafte Codierung für eine bestimmte Aminosäurefolge anzusehen.

[0069] Die einem Protein entsprechende Informationseinheit wird auch im Sinne der vorliegenden Anmeldung als Gen bezeichnet.

[0070] Einem Fachmann ist es über heutzutage allgemein bekannte Methoden, wie beispielsweise die chemische Synthese oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit molekularbiologischen und/oder proteinchemischen Standardmethoden möglich, anhand bekannter DNA- und/oder Aminosäuresequenzen die entsprechenden Nukleinsäuren bis hin zu vollständigen Genen herzustellen. Derartige Methoden sind beispielsweise aus Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 2001: Molecular cloning: a laboratory manual, 3. Edition (Cold Spring Laboratory Press) bekannt.

[0071] Änderungen der Nukleotidsequenz, wie sie beispielsweise durch an sich bekannte molekularbiologische Methoden herbeigeführt werden können, werden als Mutationen bezeichnet. Je nach Art der Änderung kennt man beispielsweise Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutationen oder solche, bei denen verschiedene Gene oder Teile von Genen miteinander fusioniert oder rekombiniert werden; dies sind Genmutationen. Die zugehörigen Organismen werden als Mutanten bezeichnet. Die von mutierten Nukleinsäuren abgeleiteten Proteine werden als Varianten bezeichnet. So führen beispielsweise Deletions-, Insertions-Substitutionsmutationen oder Fusionen zu deletions-, insertions-substitutionsmutierten oder Fusionsgenen und auf Proteinebene zu entsprechenden Deletions-, Insertions- oder Substitutionsvarianten, beziehungsweise Fusionsproteinen.

[0072] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül, das für eine erfindungsgemäße Protease kodiert, dadurch gekennzeichnet, dass es zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz zunehmend bevorzugt zu mindestens 78,5%, 80%, 82,5%, 85%, 87,5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 99,25% identisch ist.

[0073] Bevorzugt sind solche Nukleinsäuren, die für reife (mature) Proteine codieren, und zunehmend bevorzugt sind besonders solche, die für zunehmend aktive Varianten der erfindungsgemäßen Proteine codieren.

[0074] Weiterhin bevorzugt sind solche Nukleinsäuren, von denen eines oder vorzugsweise mehrere Codons durch synonyme Codons ersetzt worden sind.

[0075] Dieser Aspekt bezieht sich auf die heterologe Expression der betreffenden Proteasen. So besitzt jeder Organismus, insbesondere jeder Produktionsstamm über eine gewisse Codon-Usage. Hierbei kann es zu Engpässen in der Proteinbiosynthese kommen, wenn die auf der transgenen Nukleinsäure liegenden Codons in der Wirtszelle einer vergleichsweise geringen Zahl von beladenen tRNAs gegenüberstehen. Synonyme Codons codieren dagegen für dieselben Aminosäuren und können in Abhängigkeit vom Wirt besser translatiert werden. Dieses gegebenenfalls notwendige Umschreiben hängt somit von der Wahl des Expressionssystems. Insbesondere bei Proben aus unbekanntem, eventuell nicht kultivierbarem Organismus kann eine entsprechende Anpassung notwendig sein.

[0076] Die vorliegende Erfindung umfasst die Herstellung rekombinanter Proteine. Hierunter sind erfindungsgemäß alle gentechnischen oder mikrobiologischen Verfahren zu verstehen, die darauf beruhen, dass die Gene für die interessierenden Proteine in eine für die Produktion geeignete Wirtszelle eingebracht und von dieser transkribiert und translatiert werden. Geeigneterweise erfolgt die Einschleusung der betreffenden Gene über Vektoren, insbesondere Expressionsvektoren; aber auch über solche, die bewirken, dass das interessierende Gen in der Wirtszelle in ein bereits vorhandenes genetisches Element wie das Chromosom oder andere Vektoren eingefügt werden kann. Die funktionelle Einheit aus Gen und Promotor und eventuellen weiteren genetischen Elementen wird erfindungsgemäß als Expressionskassette bezeichnet. Sie muss dafür jedoch nicht notwendigerweise auch als physische Einheit vorliegen.

[0077] Unter Vektoren werden im Sinne der vorliegenden Erfindung aus Nukleinsäuren bestehende Elemente verstanden, die als kennzeichnenden Nukleinsäurebereich ein interessierendes Gen enthalten. Sie vermögen dieses in einer Spezies oder einer Zelllinie über mehrere Generationen oder Zellteilungen hinweg als stabiles genetisches Element zu etablieren. Vektoren sind insbesondere bei der Verwendung in Bakterien spezielle Plasmide, also zirkuläre genetische Elemente. Man unterscheidet in der Gentechnik einerseits zwischen solchen Vektoren, die der Lagerung und somit gewissermaßen auch der gentechnischen Arbeit dienen, den sogenannten Klonierungsvektoren, und andererseits denen, die die Funktion erfüllen, das interessierende Gen in der Wirtszelle zu realisieren, das heißt, die Expression des betreffenden Proteins zu ermöglichen. Diese Vektoren werden als Expressionsvektoren bezeichnet.

[0078] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird die Nukleinsäure geeigneterweise in einen Vektor kloniert. Die molekularbiologische Dimension der Erfindung besteht somit in Vektoren mit den Genen für die entsprechenden Proteine. Dazu können beispielsweise solche gehören, die sich von bakteriellen Plasmiden, von Viren oder von Bacteriophagen ableiten, oder überwiegend synthetische Vektoren oder Plasmide mit Elementen verschiedenster Herkunft. Mit den weiteren jeweils vorhandenen genetischen Elementen vermögen Vektoren, sich in den betreffenden Wirtszellen über mehrere Generationen hinweg als stabile Einheiten zu etablieren. Es ist dabei im Sinne der Erfindung unerheblich, ob sie sich extrachromosomal als eigene Einheiten etablieren oder in ein Chromosom integrieren. Welches der zahlreichen aus dem Stand der Technik bekannten Systeme gewählt wird, hängt vom Einzelfall ab. Ausschlaggebend können beispielsweise die erreichbare Kopienzahl, die zur Verfügung stehenden Selektionssysteme, darunter vor allem Antibiotikaresistenzen, oder die Kultivierbarkeit der zur Aufnahme der Vektoren befähigten Wirtszellen sein.

[0079] Die Vektoren bilden geeignete Ausgangspunkte für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen des betreffenden Gens oder zugehörigen Proteins und für erfindungsgemäße Weiterentwicklungen und letztlich für die Amplifikation und Produktion erfindungsgemäßer Proteine. Sie stellen insofern Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, als die Sequenzen der enthaltenen erfindungsgemäßen Nukleinsäurebereiche jeweils innerhalb der oben näher bezeichneten Homologiebereiche liegen.

[0080] Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen somit Vektoren dar, die mindestens ein Nukleinsäuremolekül beinhalten, welches für eine erfindungsgemäße Protease kodiert, insbesondere ein Nukleinsäuremolekül, wie es vorstehend beschrieben ist. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der Vektor dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor ein Klonierungsvektor oder ein Expressionsvektor ist. Klonierungsvektoren eignen sich neben der Lagerung, der biologischen Amplifikation oder der Selektion des interessierenden Gens für die Charakterisierung des betreffenden Gens, etwa über das Erstellen einer Restriktionskarte oder die Sequenzierung. Klonierungsvektoren sind auch deshalb bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, weil sie eine transportierbare und lagerfähige Form der beanspruchten DNA darstellen. Sie sind auch bevorzugte Ausgangspunkte für molekularbiologische Techniken, die nicht an Zellen gebunden sind, wie beispielsweise die Polymerasekettenreaktion.

[0081] Expressionsvektoren sind chemisch den Klonierungsvektoren ähnlich, unterscheiden sich aber in jenen Teilsequenzen, die sie dazu befähigen, in den für die Produktion von Proteinen optimierten Wirtszellen oder Wirtsorganismen zu replizieren und dort das enthaltene Gen zur Expression zu bringen. Bevorzugte Ausführungsformen sind Expressionsvektoren, die selbst die zur Expression notwendigen genetischen Elemente tragen. Die Expression wird beispielsweise von Promotoren beeinflusst, welche die Transkription des Gens regulieren. So kann die Expression durch den natürlichen, ursprünglich vor diesem Gen lokalisierten Promotor erfolgen, aber auch nach gentechnischer Fusion sowohl durch einen auf dem Expressionsvektor bereitgestellten Promotor der Wirtszelle als auch durch einen modifizierten oder einen völlig anderen Promotor eines anderen Organismus oder einer anderen Wirtszelle.

[0082] Bevorzugte Ausführungsformen sind solche Expressionsvektoren, die über Änderungen der Kulturbedingungen oder Zugabe von bestimmten Verbindungen, wie beispielsweise die Zelldichte oder spezielle Faktoren, regulierbar sind. Expressionsvektoren ermöglichen, dass das zugehörige Protein heterolog, also in einer anderen Zelle bzw. Wirtszelle als derjenigen, aus der es natürlicherweise gewonnen werden kann, produziert wird. Die Zellen können dabei durchaus zu verschiedenen Organismen zugehörig sein oder von verschiedenen Organismen stammen. Auch eine homologe Proteingewinnung aus einer das Gen natürlicherweise exprimierenden Wirtszelle über einen passenden Vektor liegt innerhalb des Schutzbereichs der vorliegenden Erfindung. Diese kann den Vorteil aufweisen, dass natürliche, mit der Translation in einem Zusammenhang stehende Modifikationsreaktionen an dem entstehenden Protein genauso durchgeführt werden, wie sie auch natürlicherweise ablaufen würden.

[0083] Eine weitere Ausführungsform stellen Expressionssysteme dar, bei denen zusätzliche Gene, beispielsweise solche, die auf anderen Vektoren zur Verfügung gestellt werden, die Produktion erfindungsgemäßer Proteine beeinflussen. Hierbei kann es sich um modifizierende Genprodukte handeln oder um solche, die mit dem erfindungsgemäßen Protein gemeinsam aufgereinigt werden sollen, etwa um dessen enzymatische Funktion zu beeinflussen. Dabei kann es sich beispielsweise um andere Proteine oder Enzyme, um Inhibitoren oder um solche Elemente handeln, die die Wechselwirkung mit verschiedenen Substraten beeinflussen.

[0084] Alternative Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können auch zellfreie Expressionssysteme sein, bei denen die Proteinbiosynthese in vitro nachvollzogen wird. Derartige Expressionssysteme sind im Stand der Technik ebenfalls etabliert.

[0085] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine nicht menschliche Wirtszelle, die eine erfindungsgemäße Protease oder ein Fragment derselben beinhaltet oder die zu deren Herstellung angeregt werden kann, vorzugsweise unter Einsatz eines Expressionsvektors. Die in-vivo-Synthese eines erfindungsgemäßen Enzyms, also die durch lebende Zellen, erfordert den Transfer des zugehörigen Gens in eine Wirtszelle, deren sogenannte Transformation. Als Wirtszellen eignen sich prinzipiell alle Zellen, das heißt prokaryotische oder eukaryotische Zellen. Bevorzugt sind solche Wirtszellen, die sich genetisch vorteilhaft handhaben lassen, was beispielsweise die Transformation mit dem Expressionsvektor und dessen stabile Etablierung 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. Häufig müssen aus der Fülle an verschiedenen nach dem Stand der Technik zur Verfügung stehenden Systemen die optimalen Expressionssysteme für den Einzelfall experimentell ermittelt werden. Jedes erfindungsgemäße Protein kann auf diese Weise aus einer Vielzahl von Wirtszellen gewonnen werden. Auch solche Wirtszellen sind bevorzugt, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie nach Transformation mit einem der oben beschriebenen Vektoren erhalten worden sind. Dabei kann es sich beispielsweise um Klonierungsvektoren handeln, die zur Lagerung und/oder Modifikation beispielsweise in einen beliebigen Bakterienstamm oder eine andere erfindungsgemäße Wirtszelle eingebracht worden sind. Solche Schritte sind in der Lagerung und in der Weiterentwicklung betreffender genetischer Elemente allgemein verbreitet. Da aus diesen Wirtszellen die betreffenden genetischen Elemente in nachfolgende, zur Expression geeignete Wirtszellen unmittelbar übertragen werden können, handelt es sich auch bei den vorangegangenen Transformationsprodukten um Verwirklichungen des betreffenden Erfindungsgegenstands.

[0086] Bevorzugte Ausführungsformen stellen solche Wirtszellen dar, die aufgrund genetischer Regulations-elemente, die beispielsweise auf dem Expressionsvektor zur Verfügung gestellt werden, aber auch von vornherein in diesen Zellen vorhanden sein können, in ihrer Aktivität regulierbar sind. Beispielsweise durch kontrollierte Zugabe von chemischen Verbindungen, die als Aktivatoren dienen, durch Änderung der Kultivierungsbedingungen oder bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte können diese zur Expression angeregt werden. Dies ermöglicht eine sehr wirtschaftliche Produktion der interessierenden Proteine.

[0087] Bevorzugte Wirtszellen sind prokaryontische oder bakterielle Zellen. Bakterien zeichnen sich gegenüber Eukaryonten in der Regel durch kürzere Generationszeiten und geringere Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Dadurch können kostengünstige Verfahren zur Gewinnung erfindungsgemäßer Proteine etabliert werden. Bei gramnegativen Bakterien, wie beispielsweise *Escherichia coli* (*E. coli*), werden eine Vielzahl von Proteinen in den periplasmatischen Raum sekretiert, also in das Kompartiment zwischen den beiden die Zellen einschließenden Membranen. Dies kann für spezielle Anwendungen vorteilhaft sein. Grampositive Bakterien, wie beispielsweise Bacilli oder Actinomyceten oder andere Vertreter der Actinomycetales, besitzen demgegenüber keine äußere Membran, so dass sekretierte Proteine sogleich in das die Zellen umgebende Nährmedium abgegeben werden, aus welchem sich nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die exprimierten erfindungsgemäßen Proteine direkt aufreinigen lassen.

[0088] Bevorzugtermaßen ist die Wirtszelle daher dadurch gekennzeichnet, dass sie das erfindungsgemäße Protein oder ein Fragment oder Derivat hiervon ins umgebende Medium sezerniert. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen somit Wirtszellen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie die Protease oder ein Fragment derselben in das die Wirtszelle umgebende Medium sezernieren.

[0089] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Wirtszelle dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Bakterium ist, insbesondere eines, welches ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen von *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebakterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* und *Pseudomonas*.

[0090] Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um ein Bakterium, welches ausgewählt ist aus der Gruppe von *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii gibsonii*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebakterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* und *Stenotrophomonas maltophilia*.

[0091] Die Wirtszellen können hinsichtlich ihrer Anforderungen an die Kulturbedingungen verändert sein, andere oder zusätzliche Selektionsmarker aufweisen oder andere oder zusätzliche Proteine exprimieren. Es kann sich insbesondere um solche Wirtszellen handeln, die zusätzlich zu dem erfindungsgemäß hergestellten Protein noch weitere, insbesondere wirtschaftlich interessante Proteine exprimieren.

[0092] Die Wirtszelle kann aber auch eine eukaryontische Zelle sein, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt daher eine Wirtszelle dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt.

[0093] Im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen sind eukaryontische Zellen in der Lage, das gebildete Protein posttranslational zu modifizieren. Beispiele dafür sind Pilze wie Actinomyceten oder Hefen wie *Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*. Dies kann beispielsweise dann besonders vorteilhaft sein, wenn die Proteine im Zusammenhang mit ihrer Synthese spezifische Modifikationen erfahren sollen, die derartige Systeme ermöglichen. Zu den Modifikationen, die eukaryontische Systeme besonders im Zusammenhang mit der Proteinsynthese durchführen, gehören beispielsweise die Bindung niedermolekularer Verbindungen wie Membrananker oder Oligosaccharide. Derartige Oligosaccharid-Modifikationen können beispielsweise zur Senkung der Allergenität wünschenswert sein. Auch eine Coexpression mit den natürlicherweise von derartigen Zellen gebildeten Enzymen, wie beispielsweise Cellulasen, kann vorteilhaft sein. Thermophile pilzliche Expressionssysteme eignen sich beispielsweise besonders zur Expression temperaturbeständiger Enzyme beziehungsweise von Enzymvarianten.

[0094] Die erfindungsgemäßen Wirtszellen werden in an sich bekannter Weise kultiviert und fermentiert, beispielsweise in diskontinuierlichen oder kontinuierlichen Systemen. Im ersten Fall wird ein geeignetes Nährmedium mit den Wirtszellen beimpft und das Produkt nach einem experimentell zu ermittelnden Zeitraum aus dem Medium geerntet. Kontinuierliche Fermentationen zeichnen sich durch Erreichen eines Fließgleichgewichts aus, in dem über einen vergleichsweise langen Zeitraum Zellen teilweise absterben aber auch nachwachsen und gleichzeitig Produkt aus dem Medium entnommen werden kann.

[0095] Fermentationsverfahren sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt und stellen den eigentlichen großtechnischen Produktionsschritt dar, in der Regel gefolgt von einer geeigneten Aufreinigungsmethode des hergestellten Produktes, beispielsweise des rekombinanten Proteins. Alle Fermentationsverfahren, die auf einem der oben ausgeführten Verfahren zur Herstellung der rekombinanten Proteine beruhen, stellen entsprechend bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes dar.

[0096] Hierbei müssen die für die eingesetzten Herstellungsverfahren, für die Wirtszellen und/oder die herzustellenden Proteine jeweils optimalen Bedingungen anhand der zuvor optimierten Kulturbedingungen der betreffenden Stämme nach dem Wissen des Fachmanns, beispielsweise hinsichtlich Fermentationsvolumen, Medienzusammensetzung, Sauerstoffversorgung oder Rührergeschwindigkeit experimentell ermittelt werden.

[0097] Fermentationsverfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Fermentation über eine Zulaufstrategie durchgeführt wird, kommen ebenfalls in Betracht. Hierbei werden die Medienbestandteile, die durch die fortlaufende Kultivierung verbraucht werden, zugefüttert; man spricht auch von einer Zufütterungsstrategie. Hierdurch können beträchtliche Steigerungen sowohl in der Zelldichte, als auch in der Biotrockenmasse und/oder vor allem der Aktivität des interessierenden Proteins erreicht werden.

[0098] Analog dazu kann die Fermentation auch so gestaltet werden, dass unerwünschte Stoffwechselprodukte herausgefiltert oder durch Zugabe von Puffer oder jeweils passende Gegenionen neutralisiert werden.

[0099] Das hergestellte Protein kann nachträglich aus dem Fermentationsmedium geerntet werden. Dieses Fermentationsverfahren ist gegenüber der Produktaufbereitung aus der Trockenmasse bevorzugt, erfordert jedoch die Zurverfügungstellung geeigneter Sekretionsmarker und Transportsysteme. Ohne Sekretion ist unter Umständen die Aufreinigung des Proteins aus der Zellmasse erforderlich, auch dazu sind verschiedene Verfahren bekannt, wie Fällung zum Beispiel durch Ammoniumsulfat oder Ethanol, oder die chromatographische Reinigung, wenn erforderlich bis zur Homogenität. Die Mehrzahl der beschriebenen technischen Verfahren dürfte jedoch mit einer angereicherten, stabilisierten Präparation auskommen.

[0100] Alle bereits oben ausgeführten Elemente können zu Verfahren kombiniert werden, um erfindungsgemäße Proteine herzustellen. Es ist dabei für jedes erfindungsgemäße Protein eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten an Verfahrensschritten denkbar. Das optimale Verfahren muß für jeden konkreten Einzelfall experimentell ermittelt werden.

[0101] Durch Expression oder Klonierung können die erfindungsgemäßen Proteasen in der für den technischen Einsatz erforderlichen Menge zur Verfügung gestellt werden.

[0102] Einen eigenständigen Erfindungsgegenstand stellen somit auch Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Protease dar.

[0103] Dazu gehört jedes Verfahren, das zur Herstellung einer oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Protease geeignet ist beziehungsweise das den Erhalt einer erfindungsgemäßen Protease ermöglicht. Hierzu zählen beispielsweise auch chemische Syntheseverfahren.

[0104] Demgegenüber bevorzugt sind jedoch alle im Stand der Technik etablierten, oben in einzelnen Aspekten bereits angesprochenen molekularbiologischen, mikrobiologischen, beziehungsweise biotechnologischen Herstellungsverfahren, die auf den oben bezeichneten erfindungsgemäßen Proteinen oder Nukleinsäuren aufbauen. Hierfür kann entsprechend dem oben Gesagten beispielsweise auf die im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 1 angegebene Nukleinsäure oder hieraus erhaltene Mutanten oder Teilsequenzen zurückgegriffen werden.

[0105] Vorzugsweise handelt es sich dabei um Verfahren, die unter Einsatz einer zuvor bezeichneten Nukleinsäure, vorzugsweise unter Einsatz eines vorstehend beschriebenen Vektors und besonders bevorzugt vorzugsweise unter Einsatz einer zuvor bezeichneten, vorteilhafterweise gentechnisch modifizierten Wirtszelle erfolgen. Denn hierdurch wird die entsprechend bevorzugte genetische Information in mikrobiologisch verwertbarer Form zur Verfügung gestellt.

[0106] 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.

[0107] Entsprechend dem oben Gesagten sind unter den genannten Verfahren weiterhin solche bevorzugt, bei denen die Nukleotidsequenz in einem, vorzugsweise mehreren Codons an die Codon-Usage des Wirtstamms angepasst worden ist.

[0108] Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellt ein Mittel dar, das dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine erfindungsgemäße Protease wie vorstehend beschrieben enthält.

[0109] 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.

[0110] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Mittel dadurch gekennzeichnet, dass es ein Waschmittel, Handwaschmittel, Spülmittel, Handgeschirrspülmittel, Maschinengeschirrspülmittel, Reinigungsmittel, Zahnprothesen- oder Kontaktlinsenpflegemittel, Nachspülmittel, Desinfektionsmittel, kosmetisches Mittel, pharmazeutisches Mittel oder ein Mittel zur Behandlung von Filtermedien, Textilien, Pelzen, Papier, Fellen oder Leder, ist.

[0111] Diesem Erfindungsgegenstand werden als bevorzugte Ausführungsform Mittel zugerechnet, bei denen es sich um Wasch- oder Reinigungsmittel handelt.

[0112] Denn wie in den Ausführungsbeispielen der vorliegenden Anmeldung gezeigt ist, konnte für Wasch- und Reinigungsmitteln mit einer erfindungsgemäß bevorzugten Protease eine Leistungssteigerung gegenüber einem proteasefreien Mittel festgestellt werden und eine sehr gute Reinigungsleistung im Hinblick auf Protease-sensitive Anschmutzungen erreicht werden.

[0113] Zu diesem Erfindungsgegenstand zählen alle denkbaren Reinigungsmittelarten, sowohl Konzentrate als auch 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.

[0114] Ein erfindungsgemäßes Mittel kann sowohl ein Mittel für Großverbraucher oder technische Anwender als auch ein Produkt für den Privatverbraucher sein, wobei alle im Stand der Technik etablierten Wasch- und Reinigungsmittelarten ebenfalls Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellen. Dazu gehören beispielsweise Konzentrate und unverdünnt anzuwendende Mittel zum Einsatz im kommerziellen Maßstab, in der Waschmaschine oder bei der Handwäsche beziehungsweise -reinigung. Ebenso gehören dazu beispielsweise Waschmittel für Textilien, Teppiche, oder Naturfasern, für die nach der vorliegenden Erfindung die Bezeichnung Waschmittel verwendet wird. Weiterhin gehören dazu 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.

[0115] Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen alle etablierten und/oder alle zweckmäßigen Darreichungsformen. Dazu zählen beispielsweise feste, pulverförmige, flüssige, gelförmige oder pastöse Mittel, die gegebenenfalls auch aus mehreren Phasen bestehen können sowie in komprimierter oder nicht komprimierter Form vorliegen können. Einen weiteren Erfindungsgegenstand stellen daher Mittel dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie als Einkomponentensystem vorliegen. Solche Mittel bestehen bevorzugt aus einer Phase. Selbstverständlich können erfindungsgemäße Mittel aber auch aus mehreren Phasen bestehen. Einen weiteren Erfindungsgegenstand bilden daher Mittel, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie in mehrere Komponenten aufgeteilt sind. Zu den erfindungsgemäßen Darreichungsformen zählen ferner Extrudate, Granulate, Tabletten oder Pouches, die sowohl in Großgebinden als auch portionsweise abgepackt vorliegen können. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Mittel dadurch gekennzeichnet, dass es die Protease in einer Menge von 2 µg bis 20 mg, vorzugsweise von 5 µg bis 17,5 mg, besonders bevorzugt von 20 µg bis 15 mg und ganz besonders bevorzugt von 50 µg bis 10 mg pro g des Mittels enthält.

[0116] Erfindungsgemäße Mittel können in fester Form vorliegen. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen daher Mittel dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie in fester Form vorliegen. In einer bevorzugten Ausführungsform liegt das Mittel als rieselfähiges Pulver mit einem Schüttgewicht von 300 g/l bis 1200 g/l, insbesondere 500 g/l bis 900 g/l oder 600 g/l bis 850 g/l, vor.

[0117] Alternativ können erfindungsgemäße Mittel auch flüssig oder pastös sein. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung ist das Mittel daher dadurch gekennzeichnet, dass es in pastöser oder flüssiger Form vorliegt, insbesondere in Form eines nicht-wäßrigen Flüssigwaschmittels oder einer nicht-wäßrigen Paste oder in Form eines wäßrigen Flüssigwaschmittels oder einer wasserhaltigen Paste.

[0118] Das erfindungsgemäße Mittel, insbesondere Wasch- oder Reinigungsmittel, kann in einem Behältnis, vorzugsweise einem luftdurchlässigen Behältnis, verpackt sein, aus dem es kurz vor Gebrauch oder während des Waschvorgangs freigesetzt wird, insbesondere kann die Protease und/oder weitere Inhaltsstoffe des Mittels mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für das Enzym undurchlässigen Substanz umhüllt sein, welche unter Anwendungsbedingungen des Mittels durchlässig für das Enzym wird. Das Mittel ist somit dadurch gekennzeichnet, dass die Protease mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für die Protease undurchlässigen Substanz umhüllt ist.

[0119] Erfindungsgemäße Mittel können ausschließlich eine Protease enthalten. Alternativ können sie auch weitere Proteasen oder andere Enzyme in einer für die Wirksamkeit des Mittels zweckmäßigen Konzentration enthalten. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen somit Mittel dar, die ferner eines oder mehrere weitere Enzyme umfassen, wobei prinzipiell alle im Stand der Technik für diese Zwecke etablierten Enzyme einsetzbar sind. Als weitere Enzyme bevorzugt einsetzbar sind alle Enzyme, die in dem erfindungsgemäßen Mittel eine katalytische Aktivität entfalten können, insbesondere Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Mannanasen, Tannasen, Xylanasen, Xanthanasen, β -Glucosidasen, Carrageenasen, Oxidasen, Oxidoreduktasen oder Lipasen, sowie vorzugsweise deren Gemische. Diese Enzyme sind im Prinzip natürlichen Ursprungs; ausgehend von den natürlichen Molekülen stehen für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln verbesserte Varianten zur Verfügung, die entsprechend bevorzugt eingesetzt werden. Erfindungsgemäße Mittel enthalten Enzyme vorzugsweise in Gesamtmengen von 1×10^{-8} bis 5 Gewichts-Prozent bezogen auf aktives Protein. Bevorzugt sind die Enzyme von 0,001 bis 5 Gew.-%, weiter bevorzugt von 0,01 bis 5 Gew.-%, noch weiter bevorzugt von 0,05 bis 4 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,075 bis 3,5 Gew.-% in erfindungsgemäßen Mitteln enthalten, wobei jedes enthaltene Enzym in den genannten Mengenverhältnissen vorliegen kann.

[0120] Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe bekannter Methoden, zum Beispiel dem BCA-Verfahren (Bicinchoninsäure; 2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure) oder dem Biuret-Verfahren (A. G. Gornall, C. S. Bardawill und M. M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), S. 751–766) bestimmt werden. Besonders bevorzugt unterstützen die weiteren Enzyme die Wirkung des Mittels, beispielsweise die Reinigungsleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels, hinsichtlich bestimmter Anschmutzungen oder Flecken. Besonders bevorzugt zeigen die Enzyme synergistische Effekte hinsichtlich ihrer Wirkung gegenüber bestimmter Anschmutzungen oder Flecken, d. h. die in der Mittelzusammensetzung enthaltenen Enzyme unterstützen sich in ihrer Reinigungsleistung gegenseitig. Synergistische Effekte können nicht nur zwischen verschiedenen Enzymen, sondern auch zwischen einem oder mehreren Enzymen und weiteren Inhaltsstoffen des erfindungsgemäßen Mittels auftreten. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das erfindungsgemäße Mittel somit dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens ein weiteres Enzym enthält, welches eine Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, β -Glucosidase, Carrageenase, Oxidase, Oxidoreduktase oder eine Lipase ist.

[0121] Die in erfindungsgemäßen Mitteln 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, beispielsweise durch transgene Expressionswirte der Gattungen Bacillus oder durch filamentöse Fungi.

[0122] In erfindungsgemäßen Mitteln wird die erfindungsgemäße Protease beispielsweise mit einzelnen oder mehreren der folgenden Inhaltsstoffe kombiniert: nichtionische, anionische und/oder kationische Tenside, (gegebenenfalls weitere) Bleichmittel, Bleichaktivatoren, Bleichkatalysatoren, Builder und/oder Cobuilder, Säuren, alkalische Substanzen, Hydrotropen, Lösungsmittel, Verdicker, Sequestrierungsmittel, Elektrolyte, optische Aufheller, Vergraugungsinhibitoren, Korrosionsinhibitoren, insbesondere Silberschutzmittel (Silberkorrosionsinhibitoren), Soil-Release-Wirkstoffe, Farbtransfer (oder -Übertragungs) -Inhibitoren, Schauminhibitoren, Abrasivstoffe, Farbstoffe, Duftstoffe, Parfums, antimikrobielle Wirkstoffe, UV-Schutzmittel bzw. -Absorbenzien, An-

tistatika, Perlglanzmitteln und Hautschutzmitteln, Enzyme wie beispielsweise Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, β -Glucosidase, Carrageenase, Oxidase, Oxidoreduktase oder eine Lipase, Stabilisatoren, insbesondere Enzymstabilisatoren, und andere Komponenten, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Mittel somit dadurch gekennzeichnet, dass es 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, Antistatika, Perlglanzmitteln und Hautschutzmitteln.

[0123] Die zu wählenden Inhaltsstoffe wie auch die Bedingungen, unter denen das Mittel eingesetzt wird, wie beispielsweise Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Redox-Verhältnisse oder mechanische Einflüsse, sollten für das jeweilige Reinigungsproblem optimiert sein. So liegen übliche Temperaturen für Wasch- und Reinigungsmittel in Bereichen von 10°C bei manuellen Mitteln über 40°C und 60°C bis hin zu 95° bei maschinellen Mitteln oder bei technischen Anwendungen. Da bei modernen Wasch- und Spülmaschinen die Temperatur meist stufenlos einstellbar ist, sind auch alle Zwischenstufen der Temperatur eingeschlossen. Vorzugsweise werden die Inhaltsstoffe der betreffenden Mittel aufeinander abgestimmt. Bevorzugt sind Synergien hinsichtlich der Reinigungsleistung. Besonders bevorzugt diesbezüglich sind Synergien, die in einem Temperaturbereich zwischen 20°C und 60°C vorhanden sind, da auch die in den erfindungsgemäßen Mitteln enthaltene Protease in diesem Temperaturbereich katalytisch aktiv ist.

[0124] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes Mittel, insbesondere ein Wasch- oder Reinigungsmittel, ferner

- 5 Gew.-% bis 70 Gew.-%, insbesondere 5 Gew.-% bis 30 Gew.-% Tenside und/oder
- 10 Gew.-% bis 65 Gew.-%, insbesondere 12 Gew.-% bis 60 Gew.-% wasserlösliches oder wasserdispersierbares anorganisches Buildermaterial und/oder
- 0,5 Gew.-% bis 10 Gew.-%, insbesondere 1 Gew.-% bis 8 Gew.-%, wasserlösliche organische Buildersubstanzen und/oder
- 0,01 bis 15 Gew.-% feste anorganische und/oder organische Säuren beziehungsweise saure Salze und/oder
- 0,01 bis 5 Gew.-% Komplexbildner für Schwermetalle und/oder
- 0,01 bis 5 Gew.-% Vergrauungsinhibitor und/oder
- 0,01 bis 5 Gew.-% Farbübertragungsinhibitor und/oder
- 0,01 bis 5 Gew.-% Schauminhibitor.

[0125] Optional kann das Mittel ferner optische Aufheller umfassen. Die optischen Aufheller werden bevorzugt von 0,01 bis 5 Gew.-% eingesetzt.

[0126] 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.

[0127] 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.

[0128] Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellt die Verwendung eines oben beschriebenen erfindungsgemäßen Mittels zur Entfernung von protease-sensitiven Anschmutzungen auf Textilien oder harten Oberflächen, d. h. zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen, dar.

[0129] Denn erfindungsgemäße Mittel können, insbesondere entsprechend den oben beschriebenen Eigenschaften, 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 ma-

schinellen Verfahren dar.

[0130] In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Verwendung werden die betreffenden erfindungsgemäßen Mittel, vorzugsweise Wasch- beziehungsweise Reinigungsmittel, nach einer der oben ausgeführten Ausführungsform bereitgestellt.

[0131] Einen weiteren eigenen Erfindungsgegenstand stellen Verfahren zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen dar, bei denen wenigstens in einem der Verfahrensschritte ein erfindungsgemäßes Mittel verwendet wird. Das Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen ist demnach dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein erfindungsgemäßes Mittel angewendet ist.

[0132] 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.

[0133] 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 ein erfindungsgemäßes Mittel bereichert werden, und stellen dann Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar.

[0134] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform solcher Verfahren werden die betreffenden erfindungsgemäßen Enzyme im Rahmen einer der oben ausgeführten Rezepturen für erfindungsgemäße Mittel, vorzugsweise erfindungsgemäße Wasch- beziehungsweise Reinigungsmittel, bereitgestellt.

[0135] Da bevorzugte erfindungsgemäße Enzyme 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 Enzym aufgebracht wird. Dies stellt eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar.

[0136] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen daher dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 11 proteolytisch aktiv ist. Bevorzugt wird die Protease in einer Menge von 40 µg bis 4 g, vorzugsweise von 50 µg bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 1 g pro Anwendung eingesetzt.

[0137] Bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes stellen Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen oder zur Textilpflege dar, bei denen in wenigstens einem der Verfahrensschritte eine erfindungsgemäße Alkalische Protease aktiv wird.

[0138] Hierunter sind Verfahren für Textilrohstoffe, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen bevorzugt, und ganz besonders für solche mit Wolle oder Seide.

[0139] Es kann sich dabei beispielsweise um Verfahren handeln, in denen Materialien zur Verarbeitung in Textilien vorbereitet werden, etwa zur Antifilzausrüstung, oder beispielsweise um Verfahren, welche die Reinigung getragener Textilien um eine pflegende Komponente bereichern. Wegen der oben beschriebenen Wirkung von Proteasen auf natürliche, proteinhaltige Rohstoffe handelt es sich in bevorzugten Ausführungsformen um Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen, insbesondere mit Wolle oder Seide.

[0140] Erfindungsgemäße Enzyme sind entsprechend der vorstehenden Ausführungen vorteilhaft in erfindungsgemäßen Mitteln, insbesondere Wasch- und Reinigungsmitteln, und Verfahren, insbesondere Wasch- und Reinigungsverfahren, einsetzbar. Sie können 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.

[0141] Einen weiteren Gegenstand der Erfindung bildet daher die Verwendung einer erfindungsgemäßen Protease, wie sie vorstehend beschrieben wurde zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen. Bevorzugt wird die Protease in einer Menge von 40 µg bis 4 g, vorzugsweise von 50 µg bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 1 g pro Anwendung eingesetzt.

[0142] 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.

[0143] Eine weitere Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstands stellt die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Protease zur Aktivierung oder Deaktivierung von Inhaltsstoffen von Wasch- oder Reinigungsmitteln dar.

[0144] Denn wie bekannt ist, können Protein-Bestandteile von Wasch- oder Reinigungsmitteln durch das Einwirken einer Protease inaktiviert werden. Diesen ansonsten eher unerwünschten Effekt gezielt einzusetzen, ist ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ebenso ist es wie oben beschrieben möglich, daß durch Proteolyse eine andere Komponente erst aktiviert wird, etwa, wenn sie ein Hybridprotein aus dem eigentlichen Enzym und dem dazu passenden Inhibitor darstellt. Ein anderes Beispiel für eine solche Regulation ist die, bei der eine aktive Komponente zum Schutz oder zur Kontrolle seiner Aktivität in einem Material verkapselt vorliegt, das durch Proteolyse angegriffen wird. Erfindungsgemäße Proteine können somit zu Inaktivierungs-, Aktivierungs- oder Freisetzungsreaktionen verwendet werden, insbesondere in mehrphasigen Mitteln.

[0145] Entsprechend den vorstehenden Ausführungen stellen auch folgende Verwendungen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar:

- Die Verwendung einer erfindungsgemäßen Protease zur Gewinnung oder Behandlung von Rohmaterialien oder Zwischenprodukten in der Textilherstellung, insbesondere zum Entfernen von Schutzschichten auf Geweben;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Protease zur Behandlung von Textilrohstoffen oder zur Textilpflege und hierunter bevorzugt
- die entsprechende Verwendung für Textilrohstoffe, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen und ganz besonders für solche mit Wolle oder Seide.

[0146] Die vorliegende Erfindung wird auch in Form von solchen eine erfindungsgemäße Alkalische Protease enthaltenden Mitteln verwirklicht, bei denen es sich um Kosmetika handelt. Hierunter werden alle Arten von reinigenden und pflegenden Mitteln für menschliche Haut oder Haar verstanden, insbesondere reinigende Mittel.

[0147] 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. Diesbezüglich möglich ist beispielsweise der Einsatz von Subtilisin-Proteasen, beispielsweise auch Varianten der alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* mit Aminosäureaustauschen in den Positionen R99G/A/S, S154D/E und/oder L211D/E, für kosmetische Zwecke. Wie vorstehend erläutert 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 stabilisiert und/oder durch Punktmutationen an hochallergenen Positionen so modifiziert sind, dass sie eine höhere Hautverträglichkeit aufweisen.

[0148] 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 zu dessen Herstellung ist in diesen Gegenstand eingeschlossen.

[0149] Neben dem Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln und Kosmetika sind im Stand der Technik zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten von Proteasen, insbesondere Subtilasen etabliert. Einen Überblick hierzu-

ber bietet beispielsweise das Handbuch „Industrial enzymes and their applications“ von H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998. All diese Techniken können erfindungsgemäße Alkalischen Proteasen bereichert werden. Sollte sich herausstellen, daß sie durch den Einsatz erfindungsgemäßer Proteasen weiterentwickelt werden können, so sind diese in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Hierzu gehören insbesondere folgende Einsatzgebiete:

- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen 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 einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Präparation, Reinigung oder Synthese von Naturstoffen oder biologischen Wertstoffen, vorzugsweise im Rahmen entsprechender Mittel oder Verfahren;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Synthese von Proteinen oder anderen niedermolekularen chemischen Verbindungen;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Behandlung von natürlichen Rohstoffen, insbesondere zur Oberflächenbehandlung, ganz besonders in einem Verfahren zur Behandlung von Leder, vorzugsweise im Rahmen entsprechender Mittel oder Verfahren;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Behandlung von photographischen Filmen, insbesondere zur Entfernung von gelatinhaltigen oder ähnlichen Schutzschichten; und
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Herstellung von Lebensmitteln oder von Futtermitteln.

[0150] Grundsätzlich wird der Einsatz erfindungsgemäßer Alkalischer Proteasen in allen weiteren Technikgebieten in den Schutzbereich der vorliegenden Anmeldung eingeschlossen, für die es sich als geeignet herausstellt.

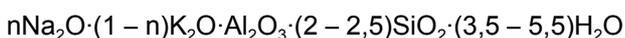
[0151] Die zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Mittel bzw. die nach dem zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Mittel enthalten gegebenenfalls weitere Inhaltsstoffe wie weitere Enzyme, Enzymstabilisatoren, Tenside, z. B. nichtionische, anionische und/oder amphotere Tenside, und/oder Bleichmittel, und/oder Builder, sowie gegebenenfalls weitere übliche Inhaltsstoffe. Insbesondere Kombinationen der erfindungsgemäßen Enzyme mit ausgewählten weiteren Inhaltsstoffen der Mittel erweisen sich als vorteilhaft und sind daher besonders bevorzugt. Besonders vorteilhafte Wirkungen zeigen sich, wenn die erfindungsgemäßen Enzyme mit Gerüststoffen (nachfolgend auch als Builder bzw. Buildersubstanzen bezeichnet), Tensiden, Bleichmitteln oder weiteren Enzymen kombiniert werden. Solche vorteilhaften Kombinationen, die eine verbesserte Reinigungsleistung durch sich ergebende Synergismen ergeben, werden nachstehend beschrieben.

Kombination erfindungsgemäßer Enzyme mit Gerüststoffen

[0152] Durch die Kombination mit ausgewählten Gerüststoffen, die nachstehend näher beschrieben werden, wird eine synergistische Reinigungsleistung des Mittels erreicht. Dies bedeutet, dass das Mittel eine verbesserte Entfernung von Verschmutzungen, beispielsweise proteinhaltigen Verschmutzungen, bewirkt im Vergleich mit Mitteln, die entweder nur eine der beiden Komponenten, also Enzyme oder Gerüststoffe, beinhalten, oder auch im Vergleich zur erwarteten Reinigungsleistung eines Mittels mit beiden Komponenten auf Grund der bloßen Addition der jeweiligen Einzelbeiträge dieser beiden Komponenten zur Reinigungsleistung des Mittels. Somit stellt die ausgewählte Kombination von erfindungsgemäßen Enzymen mit den Gerüststoffen einen wesentlichen Aspekt der Erfindung dar, die in erfindungsgemäßen Mitteln eine synergistische Wirkung aufweisen.

[0153] Zu diesbezüglich vorteilhaften Gerüststoffen zählen insbesondere die Zeolithe, Silikate, Carbonate, organische Cobuilder und – wo keine ökologischen Vorurteile gegen ihren Einsatz bestehen – auch die Phosphate.

[0154] Der eingesetzte feinkristalline, synthetische und gebundenes Wasser enthaltende 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 durch die Formel



beschrieben werden kann. Der Zeolith kann dabei sowohl als Gerüststoff in einem granularen Compound eingesetzt, als auch zu einer Art „Abpuderung“ einer granularen Mischung, vorzugsweise einer zu verpressenden Mischung verwendet werden, wobei üblicherweise beide Wege zur Inkorporation des Zeoliths in das Vorge-misch genutzt werden. 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.

[0155] Mit Vorzug werden auch kristalline schichtförmige Silikate der allgemeinen Formel $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$ eingesetzt, worin M Natrium oder Wasserstoff darstellt, x eine Zahl von 1,9 bis 22, vorzugsweise von 1,9 bis 4, wobei besonders bevorzugte Werte für x 2, 3 oder 4 sind, und y für eine Zahl von 0 bis 33, vorzugsweise von 0 bis 20 steht. Die kristallinen schichtförmigen Silikate der Formel $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$ werden beispielsweise von der Firma Clariant GmbH (Deutschland) unter dem Handelsnamen Na-SKS vertrieben. Beispiele für diese Silikate sind Na-SKS-1 ($\text{Na}_2\text{Si}_{22}\text{O}_{45} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Kenyait), Na-SKS-2 ($\text{Na}_2\text{Si}_{14}\text{O}_{29} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Magadiit), Na-SKS-3 ($\text{Na}_2\text{Si}_8\text{O}_{17} \cdot x\text{H}_2\text{O}$) oder Na-SKS-4 ($\text{Na}_2\text{Si}_4\text{O}_9 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Makatit).

[0156] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung besonders geeignet sind kristalline Schichtsilikate der Formel $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$, in denen x für 2 steht. Insbesondere sind sowohl β - als auch δ -Natriumdisilikate $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ sowie weiterhin vor allem Na-SKS-5 (α - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$), Na-SKS-7 (β - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$, Natrosilit), Na-SKS-9 ($\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Na-SKS-10 ($\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Kanemit), Na-SKS-11 (t - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$) und Na-SKS-13 (NaHSi_2O_5), insbesondere aber Na-SKS-6 (δ - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$) bevorzugt.

[0157] Wasch- oder Reinigungsmittel enthalten vorzugsweise einen Gewichtsanteil des kristallinen schichtförmigen Silikats der Formel $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$ von 0,1 bis 20 Gew.-%, bevorzugt von 0,2 bis 15 Gew.-% und insbesondere von 0,4 bis 10 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gesamtgewicht dieser Mittel.

[0158] 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 vorzugsweise 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" verstanden, 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, hervorrufen.

[0159] Alternativ oder in Kombination mit den vorgenannten amorphen Natriumsilikaten werden röntgenamorphe Silikate eingesetzt, deren Silikatpartikel bei Elektronenbeugungsexperimenten verwaschene oder sogar scharfe Beugungsmaxima liefern. Dies ist so zu interpretieren, dass die Produkte mikrokristalline Bereiche der Größe zehn bis einige Hundert Nanometer (nm) aufweisen, wobei Werte bis max. 50 nm und insbesondere bis max. 20 nm bevorzugt sind. Derartige röntgenamorphe Silikate, weisen ebenfalls eine Löseverzögerung gegenüber den herkömmlichen Wassergläsern auf. Insbesondere bevorzugt sind verdichtete/kompaktierte amorphe Silikate, compoundingierte amorphe Silikate und übertrocknete röntgenamorphe Silikate.

[0160] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, dass diese(s) Silikat(e), vorzugsweise Alkalisilikate, besonders bevorzugt kristalline oder amorphe Alkalidisilikate, in Wasch- oder Reinigungsmitteln in Mengen von 3 bis 60 Gew.-%, vorzugsweise von 8 bis 50 Gew.-% und insbesondere von 20 bis 40 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gewicht des Wasch- oder Reinigungsmittels, enthalten sind.

[0161] Selbstverständlich ist auch ein Einsatz der allgemein bekannten Phosphate als Gerüststoffe (Builder-substanzen) möglich, sofern ein derartiger Einsatz nicht aus ökologischen Gründen vermieden werden sollte. Unter der Vielzahl der kommerziell erhältlichen Phosphate sind die Alkalimetallphosphate unter besonderer Bevorzugung von Pentanatrium- bzw. Pentakaliumtriphosphat (Natrium- bzw. Kaliumtripolyphosphat) erfindungsgemäß bevorzugt.

[0162] Alkalimetallphosphate ist dabei die summarische Bezeichnung für die Alkalimetall-(insbesondere Natrium- und Kalium-)Salze der verschiedenen Phosphorsäuren, bei denen man Metaphosphorsäuren (HPO_3), und Orthophosphorsäure H_3PO_4 neben höhermolekularen Vertretern unterscheiden kann. Die Phosphate vereinigen dabei mehrere Vorteile in sich: Sie wirken als Alkaliträger, verhindern Kalkbeläge auf Maschinenteilen bzw. Kalkinkrustationen in Geweben und tragen zur Reinigungsleistung bei.

[0163] Besonders wichtige Phosphate sind das Pentanatriumtriphosphat, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (Natriumtripolyphosphat) sowie das entsprechende Kaliumsalz Pentakaliumtriphosphat, $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (Kaliumtripolyphosphat). Erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzt werden weiterhin die Natriumkaliumtripolyphosphate.

[0164] Werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung Phosphate als wasch- oder reinigungsaktive Substanzen in Wasch- oder Reinigungsmitteln eingesetzt, so enthalten bevorzugte Mittel diese(s) Phosphat(e), vorzugsweise Alkalimetallphosphat(e), besonders bevorzugt Pentanatrium- bzw. Pentakaliumtriphosphat (Natrium- bzw. Kaliumtripolyphosphat), in Mengen von 5 bis 80 Gew.-%, vorzugsweise von 15 bis 75 Gew.-% und insbesondere von 20 bis 70 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gewicht des Wasch- oder Reinigungsmittels.

[0165] Weitere erfindungsgemäß einsetzbare Gerüststoffe sind die Alkaliträger. Als Alkaliträger gelten beispielsweise Alkalimetallhydroxide, Alkalimetallcarbonate, Alkalimetallhydrogencarbonate, Alkalimetallsesquicarbonat, die genannten Alkalisilikate, Alkalimetasilikate, und Mischungen der vorgenannten Stoffe, wobei im Sinne dieser Erfindung bevorzugt die Alkalicarbonate, insbesondere Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat oder Natriumsesquicarbonat eingesetzt werden. Besonders bevorzugt ist ein Buildersystem enthaltend eine Mischung aus Tripolyphosphat und Natriumcarbonat. Aufgrund ihrer im Vergleich mit anderen Buildersubstanzen geringen chemischen Kompatibilität mit den übrigen Inhaltsstoffen von Wasch- oder Reinigungsmitteln, werden die Alkalimetallhydroxide bevorzugt nur in geringen Mengen, vorzugsweise in Mengen unterhalb 10 Gew.-%, bevorzugt unterhalb 6 Gew.-%, besonders bevorzugt unterhalb 4 Gew.-% und insbesondere unterhalb 2 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gesamtgewicht des Wasch- oder Reinigungsmittels, eingesetzt. Besonders bevorzugt werden Mittel, welche bezogen auf ihr Gesamtgewicht weniger als 0,5 Gew.-% und insbesondere keine Alkalimetallhydroxide enthalten.

[0166] Besonders bevorzugt ist der Einsatz von Carbonat(en) und/oder Hydrogencarbonat(en), vorzugsweise Alkalicarbonat(en), besonders bevorzugt Natriumcarbonat, in Mengen von 2 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise von 5 bis 40 Gew.-% und insbesondere von 7,5 bis 30 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gewicht des Wasch- oder Reinigungsmittels. Besonders bevorzugt werden Mittel, welche bezogen auf das Gewicht des Wasch- oder Reinigungsmittels weniger als 20 Gew.-%, vorzugsweise weniger als 17 Gew.-%, bevorzugt weniger als 13 Gew.-% und insbesondere weniger als 9 Gew.-% Carbonat(e) und/oder Hydrogencarbonat(e), vorzugsweise Alkalicarbonat(e), besonders bevorzugt Natriumcarbonat enthalten.

[0167] Als organische Cobuilder sind insbesondere Polycarboxylate/Polycarbonsäuren, polymere Polycarboxylate, Asparaginsäure, Polyacetale, Dextrine, weitere organische Cobuilder (siehe unten) sowie Phosphate zu nennen. Diese Stoffklassen werden nachfolgend beschrieben.

[0168] Weitere erfindungsgemäß verwendbare organische Gerüstsubstanzen sind beispielsweise die in Form der freien Säure und/oder ihrer Natriumsalze einsetzbaren Polycarbonsäuren, wobei unter Polycarbonsäuren solche Carbonsäuren verstanden werden, die mehr als eine Säurefunktion tragen. Beispielsweise sind dies Citronensäure, Adipinsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Apfelsäure, Weinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Zuckersäuren, Aminocarbonsäuren, Nitrilotriessigsäure (NTA), sofern ein derartiger Einsatz aus ökologischen Gründen nicht zu beanstanden ist, sowie Mischungen aus diesen. Die freien Säuren besitzen neben ihrer Builderwirkung typischerweise auch die Eigenschaft einer Säurekomponente und dienen somit auch zur Einstellung eines niedrigeren und mildereren pH-Wertes von Wasch- oder Reinigungsmitteln. Insbesondere sind hierbei Citronensäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Gluconsäure und beliebige Mischungen aus diesen zu nennen.

[0169] Als Gerüststoffe sind weiter polymere Polycarboxylate geeignet, dies sind beispielsweise die Alkalimetallsalze der Polyacrylsäure oder der Polymethacrylsäure, beispielsweise solche mit einer relativen Molekülmasse von 500 bis 70000 g/mol.

[0170] 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.

[0171] Geeignete Polymere sind insbesondere Polyacrylate, die bevorzugt eine Molekülmasse von 2000 bis

20000 g/mol aufweisen. Aufgrund ihrer überlegenen Löslichkeit können aus dieser Gruppe wiederum die kurzkettigen Polyacrylate, die Molmassen von 2000 bis 10000 g/mol, und besonders bevorzugt von 3000 bis 5000 g/mol, aufweisen, bevorzugt sein.

[0172] Geeignet sind weiterhin copolymerer Polycarboxylate, insbesondere solche der Acrylsäure mit Methacrylsäure und der Acrylsäure oder Methacrylsäure mit Maleinsäure. Als besonders geeignet haben sich Copolymerer 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 2000 bis 70000 g/mol, vorzugsweise 20000 bis 50000 g/mol und insbesondere 30000 bis 40000 g/mol.

[0173] Die (co-)polymeren Polycarboxylate können entweder als Pulver oder als wäßrige Lösung eingesetzt werden. Der Gehalt von Wasch- oder Reinigungsmitteln an (co-)polymeren Polycarboxylaten beträgt vorzugsweise 0,5 bis 20 Gew.-%, insbesondere 3 bis 10 Gew.-%.

[0174] Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit können die Polymere auch Allylsulfonsäuren, wie beispielsweise Allyloxybenzolsulfonsäure und Methallylsulfonsäure, als Monomer enthalten.

[0175] 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 bzw. Vinylalkohol-Derivate oder die als Monomere Salze der Acrylsäure und der 2-Alkylallylsulfonsäure sowie Zucker-Derivate enthalten.

[0176] Weitere bevorzugte Copolymerer sind solche, die als Monomere Acrolein und Acrylsäure/Acrylsäuresalze bzw. Acrolein und Vinylacetat aufweisen.

[0177] Ebenso sind als weitere bevorzugte Buildersubstanzen polymere Aminodicarbonsäuren, deren Salze oder deren Vorläufersubstanzen zu nennen. Besonders bevorzugt sind Polyasparaginsäuren bzw. deren Salze.

[0178] 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.

[0179] Weitere geeignete organische Buildersubstanzen sind Dextrine, beispielsweise Oligomere bzw. 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 50000 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, welche ein DE von 100 besitzt, ist. 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 2000 bis 30000 g/mol.

[0180] 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.

[0181] 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 zeolithhaltigen und/oder silicathaltigen Formulierungen bei 3 bis 15 Gew.-%.

[0182] Weitere brauchbare organische Cobuilder sind beispielsweise acetylierte Hydroxycarbonsäuren bzw. deren Salze, welche gegebenenfalls auch in Lactonform vorliegen können und welche mindestens 4 Kohlenstoffatome und mindestens eine Hydroxygruppe sowie maximal zwei Säuregruppen enthalten.

[0183] Darüber hinaus können alle Verbindungen, die in der Lage sind, Komplexe mit Erdalkalitionen auszubilden, ergänzend als Gerüststoffe eingesetzt werden.

[0184] Auch durch die Kombination mit ausgewählten Tensiden, welche nachstehend näher beschrieben werden, wird eine synergistische Reinigungsleistung des Mittels erreicht. Auch durch die Kombination von erfindungsgemäßen Enzymen mit solchen Tensiden wird erreicht, dass das Mittel eine verbesserte Entfernung von Anschmutzungen bewirkt im Vergleich mit Mitteln, die entweder nur eine der beiden Komponenten, also Enzyme oder Tenside, beinhalten, oder auch im Vergleich zur erwarteten Reinigungsleistung eines Mittels mit beiden Komponenten auf Grund der bloßen Addition der jeweiligen Einzelbeiträge dieser beiden Komponenten zur Reinigungsleistung des Mittels. Somit stellt auch die ausgewählte Kombination von erfindungsgemäßen Enzymen mit den Tensiden einen wesentlichen Aspekt der Erfindung dar, die in erfindungsgemäßen Mitteln eine synergistische Wirkung aufweisen.

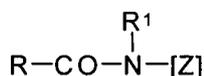
[0185] Nachfolgend werden die hierfür geeigneten Tenside näher beschrieben, gegliedert in nichtionische, anionische, kationische und amphotere Tenside.

[0186] Als nichtionische Tenside eignen sich Alkylglykoside der allgemeinen Formel $RO(G)_x$, in der R einem primären geradkettigen oder methylverzweigten, insbesondere in 2-Stellung methylverzweigten aliphatischen Rest mit 8 bis 22, vorzugsweise 12 bis 18 C-Atomen entspricht und G das Symbol ist, das für eine Glykoseeinheit mit 5 oder 6 C-Atomen, vorzugsweise für Glucose, steht. Der Oligomerisierungsgrad x, der die Verteilung von Monoglykosiden und Oligoglykosiden angibt, ist eine beliebige Zahl zwischen 1 und 10; vorzugsweise liegt x bei 1,2 bis 1,4.

[0187] Eine weitere Klasse bevorzugt einzusetzender 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.

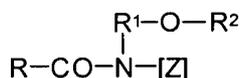
[0188] Auch nichtionische Tenside vom Typ der Aminoxide, beispielsweise N-Kokosalkyl-N,N-dimethylaminoxid und N-Talgalkyl-N,N-dihydroxyethylaminoxid, und der Fettsäurealkanolamide können geeignet sein. Die Menge dieser nichtionischen Tenside beträgt vorzugsweise nicht mehr als die der ethoxylierten Fettalkohole, insbesondere nicht mehr als die Hälfte davon.

[0189] Weitere geeignete Tenside sind Polyhydroxyfettsäureamide der Formel,



in der R 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.

[0190] Zur Gruppe der Polyhydroxyfettsäureamide gehören auch Verbindungen der Formel



in der R für einen linearen oder verzweigten Alkyl- oder Alkenylrest mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, R^1 für einen linearen, verzweigten oder zyklischen Alkylrest oder einen Arylrest mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen und R^2 für einen linearen, verzweigten oder zyklischen 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.

[0191] [Z] wird vorzugsweise durch reduktive Aminierung eines reduzierten Zuckers erhalten, beispielsweise Glucose, Fructose, Maltose, Lactose, Galactose, Mannose oder Xylose. Die N-Alkoxy- oder N-Aryloxy-substituierten Verbindungen können durch Umsetzung mit Fettsäuremethylestern in Gegenwart eines Alkoxids als Katalysator in die gewünschten Polyhydroxyfettsäureamide überführt werden.

[0192] Ebenfalls bevorzugte Tenside sind nichtionische Tenside aus der Gruppe der alkoxylierten Alkohole. Vorzugsweise handelt es sich hierbei um alkoxylierte, vorteilhafterweise ethoxylierte, insbesondere primäre Alkohole mit vorzugsweise 8 bis 18 C-Atomen und durchschnittlich 1 bis 12 Mol Ethylenoxid (EO) pro Mol Alkohol, in denen der Alkoholrest linear oder bevorzugt in 2-Stellung methylverzweigt sein kann bzw. lineare und methylverzweigte Reste im Gemisch enthalten kann, so wie sie üblicherweise in Oxoalkoholresten vorliegen. Insbesondere sind jedoch Alkoholethoxylate mit linearen Resten aus Alkoholen nativen Ursprungs mit 12 bis 18 C-Atomen, z. B. aus Kokos-, Palm-, Talgfett- oder Oleylalkohol, und durchschnittlich 2 bis 8 Mol 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 einer ganzen oder einer gebrochenen Zahl entsprechen 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.

[0193] Mit besonderem Vorzug werden ethoxylierte Niotenside, die aus C₆₋₂₀-Monohydroxyalkanolen oder C₆₋₂₀-Alkylphenolen oder C₁₆₋₂₀-Fettalkoholen und mehr als 12 Mol, vorzugsweise mehr als 15 Mol und insbesondere mehr als 20 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkohol gewonnen wurden, eingesetzt. Ein besonders bevorzugtes Niotensid wird aus einem geradkettigen Fettalkohol mit 16 bis 20 Kohlenstoffatomen (C₁₆₋₂₀-Alkohol), vorzugsweise einem C₁₈-Alkohol und mindestens 12 Mol, vorzugsweise mindestens 15 Mol und insbesondere mindestens 20 Mol Ethylenoxid gewonnen. Hierunter sind die sogenannten „narrow range ethoxylates“ besonders bevorzugt.

[0194] Mit besonderem Vorzug werden weiterhin Kombinationen aus einem oder mehreren Talgfettalkoholen mit 20 bis 30 EO und Silikonentschäumern eingesetzt.

[0195] Insbesondere bevorzugt sind nichtionische Tenside, die einen Schmelzpunkt oberhalb Raumtemperatur aufweisen. Nichtionische(s) Tensid(e) mit einem Schmelzpunkt oberhalb von 20°C, vorzugsweise oberhalb von 25°C, besonders bevorzugt zwischen 25 und 60°C und insbesondere zwischen 26,6 und 43,3°C, ist/sind besonders bevorzugt.

[0196] Geeignete nichtionische Tenside, die Schmelz- bzw. Erweichungspunkte im genannten Temperaturbereich aufweisen, sind beispielsweise schwachschäumende nichtionische Tenside, die bei Raumtemperatur fest oder hochviskos sein können. Werden Niotenside eingesetzt, die bei Raumtemperatur hochviskos sind, so ist bevorzugt, dass diese eine Viskosität oberhalb von 20 Pa·s, vorzugsweise oberhalb von 35 Pa·s und insbesondere oberhalb 40 Pa·s aufweisen. Auch Niotenside, die bei Raumtemperatur wachsartige Konsistenz besitzen, sind in Abhängigkeit von ihrem Anwendungszweck bevorzugt.

[0197] Niotenside aus der Gruppe der alkoxylierten Alkohole, besonders bevorzugt aus der Gruppe der gemischt alkoxylierten Alkohole und insbesondere aus der Gruppe der EO-AO-EO-Niotenside, werden ebenfalls mit besonderem Vorzug eingesetzt.

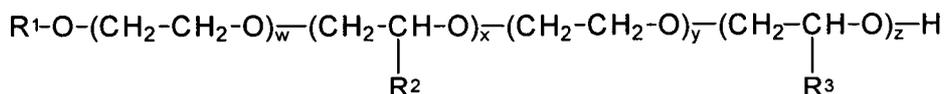
[0198] Das bei Raumtemperatur feste Niotensid besitzt vorzugsweise Propylenoxideinheiten im Molekül. Vorzugsweise machen solche Propylenoxideinheiten bis zu 25 Gew.-%, besonders bevorzugt bis zu 20 Gew.-% und insbesondere bis zu 15 Gew.-% der gesamten Molmasse des nichtionischen Tensids aus. Besonders bevorzugte nichtionische Tenside sind ethoxylierte Monohydroxyalkanole oder Alkylphenole, die zusätzlich Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymerseinheiten aufweisen. Der Alkohol- bzw. Alkylphenolanteil solcher Niotensidmoleküle macht dabei vorzugsweise mehr als 30 Gew.-%, besonders bevorzugt mehr als 50 Gew.-% und insbesondere mehr als 70 Gew.-% der gesamten Molmasse solcher Niotenside aus. Bevorzugte Mittel sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ethoxylierte und propoxylierte Niotenside enthalten, bei denen die Propylenoxideinheiten im Molekül bis zu 25 Gew.-%, bevorzugt bis zu 20 Gew.-% und insbesondere bis zu 15 Gew.-% der gesamten Molmasse des nichtionischen Tensids ausmachen.

[0199] Bevorzugt einzusetzende Tenside stammen aus den Gruppen der alkoxylierten Niotenside, insbesondere der ethoxylierten primären Alkohole und Mischungen dieser Tenside mit strukturell komplizierter aufgebauten Tensiden wie Polyoxypropylen/Polyoxyethylen/Polyoxypropylen ((PO/EO/PO)-Tenside). Solche (PO/EO/PO)-Niotenside zeichnen sich darüber hinaus durch gute Schaumkontrolle aus.

[0200] Weitere besonders bevorzugt einzusetzende Niotenside mit Schmelzpunkten oberhalb Raumtempe-

ratur enthalten 40 bis 70% eines Polyoxypropylen/Polyoxyethylen/Polyoxypropylen-Blockpolymerblends, der 75 Gew.-% eines umgekehrten Block-Copolymers von Polyoxyethylen und Polyoxypropylen mit 17 Mol Ethylenoxid und 44 Mol Propylenoxid und 25 Gew.-% eines Block-Copolymers von Polyoxyethylen und Polyoxypropylen, initiiert mit Trimethylolpropan und enthaltend 24 Mol Ethylenoxid und 99 Mol Propylenoxid pro Mol Trimethylolpropan, enthält.

[0201] Als besonders bevorzugte Niotenside haben sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung schwach-schäumende Niotenside erwiesen, welche alternierende Ethylenoxid- und Alkylenoxideinheiten aufweisen. Unter diesen sind wiederum Tenside mit EO-AO-EO-AO-Blöcken bevorzugt, wobei jeweils eine bis zehn EO- bzw. AO-Gruppen aneinander gebunden sind, bevor ein Block aus den jeweils anderen Gruppen folgt. Hier sind nichtionische Tenside der allgemeinen Formel



bevorzugt, in der R^1 für einen geradkettigen oder verzweigten, gesättigten oder ein- bzw. mehrfach ungesättigten C_{6-24} -Alkyl- oder -Alkenylrest steht; jede Gruppe R^2 bzw. R^3 unabhängig voneinander ausgewählt ist aus $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2-CH_3$, $CH(CH_3)_2$ und die Indizes w , x , y , z unabhängig voneinander für ganze Zahlen von 1 bis 6 stehen.

[0202] Die bevorzugten Niotenside der vorstehenden Formel lassen sich durch bekannte Methoden aus den entsprechenden Alkoholen R^1-OH und Ethylen- bzw. Alkylenoxid herstellen. Der Rest R^1 in der vorstehenden Formel kann je nach Herkunft des Alkohols variieren. Werden native Quellen genutzt, weist der Rest R^1 eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen auf und ist in der Regel unverzweigt, wobei die linearen Reste aus Alkoholen nativen Ursprungs mit 12 bis 18 C-Atomen, z. B. aus Kokos-, Palm-, Talgfett- oder Oleylalkohol, bevorzugt sind. Aus synthetischen Quellen zugängliche Alkohole sind beispielsweise die Guerbetalkohole oder in 2-Stellung methylverzweigte bzw. lineare und methylverzweigte Reste im Gemisch, so wie sie üblicherweise in Oxoalkoholresten vorliegen. Unabhängig von der Art des zur Herstellung der in den Mitteln enthaltenen Niotenside eingesetzten Alkohols sind Niotenside bevorzugt, bei denen R^1 in der vorstehenden Formel für einen Alkylrest mit 6 bis 24, vorzugsweise 8 bis 20, besonders bevorzugt 9 bis 15 und insbesondere 9 bis 11 Kohlenstoffatomen steht.

[0203] Als Alkylenoxideinheit, die alternierend zur Ethylenoxideinheit in den bevorzugten Niotensiden enthalten ist, kommt neben Propylenoxid insbesondere Butylenoxid in Betracht. Aber auch weitere Alkylenoxide, bei denen R^2 bzw. R^3 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus $-CH_2CH_2-CH_3$ bzw. $CH(CH_3)_2$ sind geeignet. Bevorzugt werden Niotenside der vorstehenden Formel eingesetzt, bei denen R^2 bzw. R^3 für einen Rest $-CH_3$, w und x unabhängig voneinander für Werte von 3 oder 4 und y und z unabhängig voneinander für Werte von 1 oder 2 stehen.

[0204] Zusammenfassend sind insbesondere nichtionische Tenside bevorzugt, die einen C_{9-15} -Alkylrest mit 1 bis 4 Ethylenoxideinheiten, gefolgt von 1 bis 4 Propylenoxideinheiten, gefolgt von 1 bis 4 Ethylenoxideinheiten, gefolgt von 1 bis 4 Propylenoxideinheiten aufweisen. Diese Tenside weisen in wässriger Lösung die erforderliche niedrige Viskosität auf und sind erfindungsgemäß mit besonderem Vorzug einsetzbar, insbesondere wie vorstehend beschrieben durch deren synergistische Kombination mit erfindungsgemäßen Enzymen.

[0205] Tenside der allgemeinen Formel



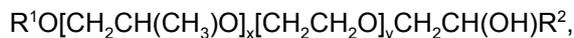
R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen geradkettigen oder verzweigten, gesättigten oder ein- bzw. mehrfach ungesättigten C_{2-40} -Alkyl- oder -Alkenylrest steht; A , A' , A'' und A''' unabhängig voneinander für einen Rest aus der Gruppe $-CH_2CH_2$, $-CH_2CH_2-CH_2$, $-CH_2-CH(CH_3)$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$, $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2$, $-CH_2-CH(CH_2-CH_3)$ steht; und w , x , y und z für Werte zwischen 0,5 und 90 stehen, wobei x , y und/oder z auch 0 sein können sind erfindungsgemäß bevorzugt.

[0206] Bevorzugt werden insbesondere solche endgruppenverschlossene poly(oxyalkylierten) Niotenside, die gemäß der Formel



neben einem Rest R^1 , welcher für lineare oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffreste mit 2 bis 30 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise mit 4 bis 22 Kohlenstoffatomen steht, weiterhin einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest R^2 mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen aufweisen, wobei x für Werte zwischen 1 und 90, vorzugsweise für Werte zwischen 40 und 80 und insbesondere für Werte zwischen 40 und 60 steht.

[0207] Besonders bevorzugt sind Tenside der Formel



in der R^1 für einen linearen oder verzweigten aliphatischen Kohlenwasserstoffrest mit 4 bis 18 Kohlenstoffatomen oder Mischungen hieraus steht, R^2 einen linearen oder verzweigten Kohlenwasserstoffrest mit 2 bis 26 Kohlenstoffatomen oder Mischungen hieraus bezeichnet und x für Werte zwischen 0,5 und 1,5 sowie y für einen Wert von mindestens 15 steht.

[0208] Besonders bevorzugt werden weiterhin solche endgruppenverschlossene poly(oxyalkylierten) Niotenside der Formel



in der R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- bzw. mehrfach ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 2 bis 26 Kohlenstoffatomen steht, R^3 unabhängig voneinander ausgewählt ist aus $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2-CH_3$, $CH(CH_3)_2$, vorzugsweise jedoch für $-CH_3$ steht, und x und y unabhängig voneinander für Werte zwischen 1 und 32 stehen, wobei Niotenside mit $R^3 = -CH_3$ und Werten für x von 15 bis 32 und y von 0,5 und 1,5 ganz besonders bevorzugt sind.

[0209] Weitere bevorzugt einsetzbare Niotenside sind die endgruppenverschlossenen poly(oxyalkylierten) Niotenside der Formel



in der R^1 und R^2 für lineare oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffreste mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen stehen, R^3 für H oder einen Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, iso-Propyl, n-Butyl-, 2-Butyl- oder 2-Methyl-2-Butylrest steht, x für Werte zwischen 1 und 30, k und j für Werte zwischen 1 und 12, vorzugsweise zwischen 1 und 5 stehen. Wenn der Wert $x \geq 2$ ist, kann jedes R^3 in der obenstehenden Formel $R^1O[CH_2CH(R^3)O]_x[CH_2]_kCH(OH)[CH_2]_jOR^2$ unterschiedlich sein. R^1 und R^2 sind vorzugsweise lineare oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffreste mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, wobei Reste mit 8 bis 18 C-Atomen besonders bevorzugt sind. Für den Rest R^3 sind H, $-CH_3$ oder $-CH_2CH_3$ besonders bevorzugt. Besonders bevorzugte Werte für x liegen im Bereich von 1 bis 20, insbesondere von 6 bis 15.

[0210] Wie vorstehend beschrieben, kann jedes R^3 in der obenstehenden Formel unterschiedlich sein, falls $x \geq 2$ ist. Hierdurch kann die Alkylenoxideinheit in der eckigen Klammer variiert werden. Steht x beispielsweise für 3, kann der Rest R^3 ausgewählt werden, um Ethylenoxid- ($R^3 = H$) oder Propylenoxid- ($R^3 = CH_3$) Einheiten zu bilden, die in jedweder Reihenfolge aneinandergesetzt sein können, beispielsweise (EO)(PO)(EO), (EO)(EO)(PO), (EO)(EO)(EO), (PO)(EO)(PO), (PO)(PO)(EO) und (PO)(PO)(PO). Der Wert 3 für x ist hierbei beispielhaft gewählt worden und kann durchaus größer sein, wobei die Variationsbreite mit steigenden x -Werten zunimmt und beispielsweise eine große Anzahl (EO)-Gruppen, kombiniert mit einer geringen Anzahl (PO)-Gruppen einschließt, oder umgekehrt.

[0211] Besonders bevorzugte endgruppenverschlossene poly(oxyalkylierte) Alkohole der obenstehenden Formel weisen Werte von $k = 1$ und $j = 1$ auf, so dass sich die vorstehende Formel zu



vereinfacht. In der letztgenannten Formel sind R^1 , R^2 und R^3 wie oben definiert und x steht für Zahlen von 1 bis 30, vorzugsweise von 1 bis 20 und insbesondere von 6 bis 18. Besonders bevorzugt sind Tenside, bei denen die Reste R^1 und R^2 9 bis 14 C-Atome aufweisen, R^3 für H steht und x Werte von 6 bis 15 annimmt.

[0212] Die angegebenen C-Kettenlängen sowie Ethoxylierungsgrade bzw. Alkoxylierungsgrade der vorge-

nannten Niotenside stellen statistische Mittelwerte dar, die für ein spezielles Produkt eine ganze oder eine gebrochene Zahl sein können. Aufgrund der Herstellverfahren bestehen Handelsprodukte der genannten Formeln zumeist nicht aus einem individuellen Vertreter, sondern aus Gemischen, wodurch sich sowohl für die C-Kettenlängen als auch für die Ethoxyierungsgrade bzw. Alkoxyierungsgrade Mittelwerte und daraus folgend gebrochene Zahlen ergeben können.

[0213] Selbstverständlich können die vorgenannten nichtionischen Tenside nicht nur als Einzelsubstanzen, sondern auch als Tensidgemische aus zwei, drei, vier oder mehr Tensiden eingesetzt werden. Als Tensidgemische werden dabei nicht Mischungen nichtionischer Tenside bezeichnet, die in ihrer Gesamtheit unter eine der oben genannten allgemeinen Formeln fallen, sondern vielmehr solche Mischungen, die zwei, drei, vier oder mehr nichtionische Tenside enthalten, die durch unterschiedliche der vorgenannten allgemeinen Formeln beschrieben werden können.

[0214] Als anionische Tenside sind beispielsweise solche vom Typ der Sulfonate und Sulfate erfindungsgemäß einsetzbar. Als Tenside vom Sulfonat-Typ kommen dabei vorzugsweise C₉₋₁₃-Alkylbenzolsulfonate, Olefinsulfonate, d. h. 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 bzw. Neutralisation gewonnen werden. Ebenso sind auch die Ester von α -Sulfofettsäuren (Estersulfonate), z. B. die α -sulfonierten Methylester der hydrierten Kokos-, Palmkern- oder Talgfettsäuren geeignet.

[0215] Weitere geeignete Aniontenside sind sulfurierte 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 sulfurierte Fettsäureglycerinester sind dabei die Sulfierprodukte von gesättigten Fettsäuren mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, beispielsweise der Capronsäure, Caprylsäure, Caprinsäure, Myristinsäure, Laurinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure oder Behensäure.

[0216] Als Alk(en)ylsulfate werden die Alkali- und insbesondere die Natriumsalze der Schwefelsäurehalbester der C₁₂-C₁₈-Fettalkohole, beispielsweise aus Kokosfettalkohol, Talgfettalkohol, Lauryl-, Myristyl-, Cetyl- oder Stearylalkohol oder der C₁₀-C₂₀-Oxoalkohole und diejenigen Halbester 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, welche als Handelsprodukte der Shell Oil Company unter dem Namen DAN[®] erhalten werden können, sind geeignete Aniontenside.

[0217] 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. Auf Grund ihres hohen Schaumverhaltens werden sie nur in relativ geringen Mengen, beispielsweise in Mengen von 1 bis 5 Gew.-%, eingesetzt.

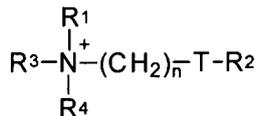
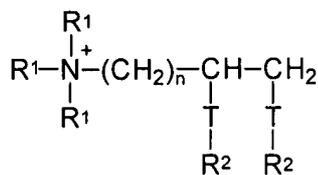
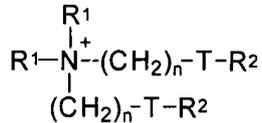
[0218] Weitere geeignete Aniontenside sind auch die Salze der Alkylsulfobornsteinsäure, die auch als Sulfosuccinate oder als Sulfobernsteinsäureester bezeichnet werden und die Monoester und/oder Diester der Sulfobernsteinsäure mit Alkoholen, vorzugsweise Fettalkoholen und insbesondere ethoxylierten Fettalkoholen, 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. Dabei sind wiederum Sulfosuccinate, deren Fettalkohol-Reste sich von ethoxylierten Fettalkoholen mit eingengter Homologenverteilung ableiten, besonders bevorzugt. Ebenso ist es auch möglich, Alk(en)ylbornsteinsäure mit vorzugsweise 8 bis 18 Kohlenstoffatomen in der Alk(en)ylkette oder deren Salze einzusetzen.

[0219] Als weitere anionische Tenside kommen insbesondere Seifen in Betracht. Geeignet sind gesättigte Fettsäureseifen, wie die Salze der Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, hydrierte Eruca-säure und Behensäure sowie insbesondere aus natürlichen Fettsäuren, z. B. Kokos-, Palmkern- oder Talgfettsäuren, abgeleitete Seifengemische.

[0220] 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.

[0221] An Stelle der genannten Tenside oder in Verbindung mit ihnen können zudem kationische und/oder amphotere Tenside eingesetzt werden.

[0222] Als solche kationische Aktivsubstanzen können beispielsweise kationische Verbindungen der nachfolgenden Formeln eingesetzt werden:



worin jede Gruppe R^1 unabhängig voneinander ausgewählt ist aus C_{1-6} -Alkyl-, -Alkenyl- oder -Hydroxyalkylgruppen; jede Gruppe R^2 unabhängig voneinander ausgewählt ist aus C_{8-28} -Alkyl- oder -Alkenylgruppen; $\text{R}^3 = \text{R}^1$ oder $(\text{CH}_2)_n-\text{T}-\text{R}^2$; $\text{R}^4 = \text{R}^1$ oder R^2 oder $(\text{CH}_2)_n-\text{T}-\text{R}^2$; $\text{T} = -\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CO}-$ oder $-\text{CO}-\text{O}-$ und n eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist.

[0223] In maschinellen Geschirrspülmitteln, beträgt der Gehalt an kationischen und/oder amphoteren Tensiden vorzugsweise weniger als 6 Gew.-%, bevorzugt weniger als 4 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt weniger als 2 Gew.-% und insbesondere weniger als 1 Gew.-%. Maschinelle Geschirrspülmittel, welche keine kationischen oder amphoteren Tenside enthalten, werden besonders bevorzugt.

Kombination erfindungsgemäßer Enzyme mit Bleichmitteln

[0224] Weiterhin wird durch die Kombination erfindungsgemäßer Enzyme mit ausgewählten Bleichmitteln, welche nachstehend näher beschrieben werden, eine synergistische Reinigungsleistung des Mittels erreicht. Ein solches Mittel bewirkt eine verbesserte Entfernung von Anschmutzungen im Vergleich mit Mitteln, die entweder nur eine der beiden Komponenten, also Enzyme oder Bleichmittel, beinhalten, oder auch im Vergleich zur erwarteten Reinigungsleistung eines Mittels mit beiden Komponenten auf Grund der bloßen Addition der jeweiligen Einzelbeiträge dieser beiden Komponenten zur Reinigungsleistung des Mittels. Somit stellt auch die ausgewählte Kombination von erfindungsgemäßen Enzymen mit solchen Bleichmitteln einen wesentlichen Aspekt der Erfindung dar, die in erfindungsgemäßen Mitteln eine synergistische Wirkung aufweisen.

[0225] Nachfolgend werden die hierfür geeigneten Bleichmittel näher beschrieben. Unter den als Bleichmittel dienenden, in Wasser H_2O_2 liefernden Verbindungen haben das Natriumpercarbonat, das Natriumperborat-tetrahydrat und das Natriumperboratmonohydrat besondere Bedeutung. Weitere erfindungsgemäß einsetzbare Bleichmittel sind beispielsweise Peroxypyrophosphate, Citratperhydrate sowie H_2O_2 liefernde persaurer Salze oder Persäuren, wie Perbenzoate, Peroxophthalate, Dipiperazelaensäure, Phthaloiminopersäure oder Dipiperdoecandisäure.

[0226] Zudem können auch Bleichmittel aus der Gruppe der organischen Bleichmittel eingesetzt werden. Typische organische Bleichmittel sind die Diacylperoxide, wie z. B. Dibenzoylperoxid. Weitere typische organi-

sche Bleichmittel sind die Peroxysäuren, wobei insbesondere die Alkylperoxysäuren und die Arylperoxysäuren eingesetzt werden. Bevorzugte Vertreter sind (a) die Peroxybenzoesäure und ihre ringsubstituierten Derivate, wie Alkylperoxybenzoesäuren, aber auch Peroxy- α -Naphthoesäure und Magnesiummonoperphthalat, (b) die aliphatischen oder substituiert aliphatischen Peroxysäuren, wie Peroxylaurinsäure, Peroxystearinsäure, ϵ -Phthalimidoperoxycaprinsäure [Phthaliminoperoxyhexansäure (PAP)], o-Carboxybenzamidoperoxycaprinsäure, N-Nonenylamidoperadipinsäure und N-Nonenylamidopersuccinate, und (c) 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-aminopercaprinsäure).

[0227] Weitere erfindungsgemäß einsetzbare Bleichmittel stellen enzymatische und chemischenzymatische Bleichsysteme dar. Hierbei wird ein geeignetes Substrat durch ein entsprechendes Enzym umgesetzt, so dass Wasserstoff-Peroxid entsteht. Dieses kann dann enzymatisch oder chemisch aktiviert werden. Umgekehrt kann auch chemisch freigesetztes Wasserstoff-Peroxid durch ein enzymatisches System in eine aktivierte Form übertragen werden.

[0228] Als Bleichmittel können auch Chlor oder Brom freisetzende Substanzen eingesetzt werden. Unter den geeigneten Chlor oder Brom freisetzenden Materialien kommen beispielsweise heterozyklische N-Brom- und N-Chloramide, beispielsweise Trichlorisocyanursäure, Tribromisocyanursäure, Dibromisocyanursäure und/oder Dichlorisocyanursäure (DICH) und/oder deren Salze mit Kationen wie Kalium und Natrium in Betracht. Hydantoinverbindungen, wie 1,3-Dichlor-5,5-dimethylhydantoin sind ebenfalls geeignet.

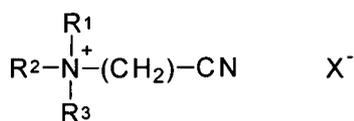
[0229] Erfindungsgemäß werden Wasch- oder Reinigungsmittel, insbesondere maschinelle Geschirrspülmittel, bevorzugt, die 1 bis 35 Gew.-%, vorzugsweise 2,5 bis 30 Gew.-%, besonders bevorzugt 3,5 bis 20 Gew.-% und insbesondere 5 bis 15 Gew.-% Bleichmittel, vorzugsweise Natriumpercarbonat, enthalten.

[0230] Der Aktivsauerstoffgehalt der Wasch- oder Reinigungsmittel, insbesondere der maschinellen Geschirrspülmittel, beträgt, jeweils bezogen auf das Gesamtgewicht des Mittels, vorzugsweise zwischen 0,4 und 10 Gew.-%, besonders bevorzugt zwischen 0,5 und 8 Gew.-% und insbesondere zwischen 0,6 und 5 Gew.-%. Besonders bevorzugte Mittel weisen einen Aktivsauerstoffgehalt oberhalb 0,3 Gew.-%, bevorzugt oberhalb 0,7 Gew.-%, besonders bevorzugt oberhalb 0,8 Gew.-% und insbesondere oberhalb 1,0 Gew.-% auf.

[0231] Erfindungsgemäß bevorzugt einsetzbare Bleichmittel können ferner Bleichaktivatoren umfassen, beispielsweise um beim Reinigen bei Temperaturen von 60°C und darunter eine nochmals verbesserte Bleichwirkung zu erreichen. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass auch eine Kombination von erfindungsgemäßen Enzymen mit bestimmten, nachfolgend näher beschriebenen Bleichaktivatoren, synergistische Reinigungseffekte eines entsprechenden Mittels bewirkt. Solche Bleichaktivatoren sind 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. 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 Glykolorile, insbesondere Tetraacetylglykoloril (TAGU), N-Acylimide, insbesondere N-Nonanoylsuccinimid (NOSI), acylierte Phenolsulfonate, insbesondere n-Nonanoyl- oder Isononanoyloxybenzolsulfonat (n- bzw. iso-NOBS), Carbonsäureanhydride, insbesondere Phthalsäureanhydrid, acylierte mehrwertige Alkohole, insbesondere Triacetin, Ethylenglykoldiacetat und 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran, n-Methyl-Morpholinium-Acetonitril-Methylsulfat (MMA) sowie acetyliertes Sorbitol und Mannitol beziehungsweise deren Mischungen (SORMAN), acylierte Zuckerderivate, insbesondere Pentaacetylglukose (PAG), Pentaacetylfruktose, Tetraacetylxylose und Octaacetyllactose sowie acetyliertes, gegebenenfalls N-alkyliertes Glucamin und Gluconolacton, und/oder N-acylierte Lactame, beispielsweise N-Benzoylcaprolactam. Hydrophil substituierte Acylacetale und Acyllactame werden ebenfalls bevorzugt eingesetzt. Auch Kombinationen konventioneller Bleichaktivatoren können eingesetzt werden.

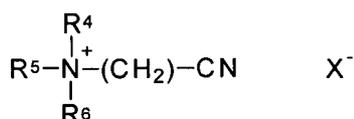
[0232] Diese Bleichaktivatoren werden vorzugsweise in Mengen bis 10 Gew.-%, insbesondere 0,1 Gew.-% bis 8 Gew.-%, besonders 2 bis 8 Gew.-% und besonders bevorzugt 2 bis 6 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gesamtgewicht der bleichaktivatorhaltigen Mittel, eingesetzt.

[0233] Weitere im Rahmen der vorliegenden Anmeldung bevorzugt eingesetzte Bleichaktivatoren sind Verbindungen aus der Gruppe der kationischen Nitrile, insbesondere kationische Nitrile der Formel



in der R¹ für -H, -CH₃, einen C₂₋₂₄-Alkyl- oder -Alkenylrest, einen substituierten C₂₋₂₄-Alkyl- oder -Alkenylrest mit mindestens einem Substituenten aus der Gruppe -Cl, -Br, -OH, -NH₂, -CN, einen Alkyl- oder Alkenylrest mit einer C₁₋₂₄-Alkylgruppe, oder für einen substituierten Alkyl- oder Alkenylrest mit einer C₁₋₂₄-Alkylgruppe und mindestens einem weiteren Substituenten am aromatischen Ring steht, R² und R³ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus -CH₂-CN, -CH₃, -CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-CH₃, -CH(CH₃)-CH₃, -CH₂-OH, -CH₂-CH₂-OH, -CH(OH)-CH₃, -CH₂-CH₂-CH₂-OH, -CH₂-CH(OH)-CH₃, -CH(OH)-CH₂-CH₃, -(CH₂CH₂-O)_nH mit n = 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 und X ein Anion ist.

[0234] Besonders bevorzugt ist ein kationisches Nitril der Formel



in der R⁴, R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus -CH₃, -CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-CH₃, -CH(CH₃)-CH₃, wobei R⁴ zusätzlich auch -H sein kann und X ein Anion ist, wobei vorzugsweise R⁵ = R⁶ = -CH₃ und insbesondere R⁴ = R⁵ = R⁶ = -CH₃ gilt und Verbindungen der Formeln (CH₃)₃N⁽⁺⁾CH₂-CN X⁻, (CH₃CH₂)₃N⁽⁺⁾CH₂-CN X⁻, (CH₃CH₂CH₂)₃N⁽⁺⁾CH₂-CN X⁻, (CH₃CH(CH₃))₃N⁽⁺⁾CH₂-CN X⁻, oder (HO-CH₂-CH₂)₃N⁽⁺⁾CH₂-CN X⁻ besonders bevorzugt sind, wobei aus der Gruppe dieser Substanzen wiederum das kationische Nitril der Formel (CH₃)₃N⁽⁺⁾CH₂-CN X⁻, in welcher X⁻ für ein Anion steht, das aus der Gruppe Chlorid, Bromid, Iodid, Hydrogensulfat, Methosulfat, p-Toluolsulfonat (Tosylat) oder Xyloisulfonat ausgewählt ist, besonders bevorzugt wird.

[0235] Erfindungsgemäß bevorzugt einsetzbare Bleichmittel können zusätzlich zu den Bleichaktivatoren oder an deren Stelle auch Bleichkatalysatoren umfassen. Bei diesen Stoffen handelt es sich um bleichverstärkende Übergangsmetallsalze bzw. 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 verwendbar.

[0236] Bleichverstärkende Übergangsmetallkomplexe, insbesondere mit den Zentralatomen Mn, Fe, Co, Cu, Mo, V, Ti und/oder Ru, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Mangan- und/oder Cobaltsalze und/oder -komplexe, besonders bevorzugt der Cobalt(ammin)-Komplexe, der Cobalt(acetat)-Komplexe, der Cobalt(Carbonyl)-Komplexe, der Chloride des Cobalts oder Mangans, des Mangansulfats werden in üblichen Mengen, vorzugsweise in einer Menge bis zu 5 Gew.-%, insbesondere von 0,0025 Gew.-% bis 1 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,01 Gew.-% bis 0,25 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gesamtgewicht der erfindungsgemäßen Mittel, eingesetzt. In speziellen Fällen kann jedoch auch mehr Bleichaktivator eingesetzt werden.

[0237] Mit besonderem Vorzug werden Komplexe des Mangans in der Oxidationsstufe II, III, IV oder IV eingesetzt, die vorzugsweise einen oder mehrere makrocyclische(n) Ligand(en) mit den Donorfunktionen N, NR, PR, O und/oder S enthalten. Vorzugsweise werden Liganden eingesetzt, die Stickstoff-Donorfunktionen aufweisen. Dabei ist es besonders bevorzugt, Bleichkatalysator(en) in den erfindungsgemäßen Mitteln einzusetzen, welche als makromolekulare Liganden 1,4,7-Trimethyl-1,4,7-triazacyclononan (Me-TACN), 1,4,7-Triaza-cyclononan (TACN), 1,5,9-Trimethyl-1,5,9-triazacyclododecan (Me-TACD), 2-Methyl-1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyclononan (Me/Me-TACN) und/oder 2-Methyl-1,4,7-triazacyclononan (Me/TACN) enthalten. Geeignete Mangankomplexe sind beispielsweise [Mn^{III}₂(μ-O)₁(μ-OAc)₂(TACN)₂](ClO₄)₂, [Mn^{III}Mn^{IV}(μ-O)₂(μ-OAc)₁(TACN)₂](BPh₄)₂, [Mn^{IV}(μ-O)₆(TACN)₄](ClO₄)₄, [Mn^{III}₂(μ-O)₁(μ-OAc)₂(Me-TACN)₂](ClO₄)₂, [Mn^{II}Mn^{IV}(μ-O)₁(μ-OAc)₂(Me-TACN)₂](ClO₄)₃, [Mn^{IV}₂(μ-O)₃(Me-TACN)₂](PF₆)₂ und [Mn^{IV}₂(μ-O)₃(Me/Me-TACN)₂](PF₆)₂(OAc = OC(O)CH₃).

Kombination erfindungsgemäßer Enzyme mit weiteren Enzymen

[0238] Auch die Kombination erfindungsgemäßer Enzyme mit weiteren Enzymen, welche nachstehend näher beschrieben werden, bewirkt eine synergistische Reinigungsleistung des Mittels. Für Mittel enthaltend ausgewählte Enzymkombinationen wurde eine verbesserte Entfernung von Anschmutzungen festgestellt im Vergleich mit Mitteln, die entweder nur eines der Enzyme enthalten oder auch im Vergleich zur erwarteten Reini-

gungsleistung eines Mittels mit beiden Komponenten auf Grund der bloßen Addition der jeweiligen Einzelbeiträge dieser beiden Komponenten zur Reinigungsleistung des Mittels. Die unterschiedlichen Enzyme unterstützen sich somit gegenseitig in ihrem Wirken. Somit stellt auch die ausgewählte Kombination von erfindungsgemäßen Enzymen mit weiteren Enzymen einen wesentlichen Aspekt der Erfindung dar.

[0239] Hierzu zählen insbesondere Enzyme, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, β -Glucosidase, Carrageenase, Oxidase, Oxidoreduktase, Pektinabbauendes Enzym oder Lipase. Auch Enzymgemische aus mehreren verschiedenen Enzymarten, beispielsweise erfindungsgemäße Enzyme in Kombination mit Amylasen und Lipasen, erfindungsgemäße Enzyme in Kombination mit Amylasen und Cellulasen, erfindungsgemäße Enzyme in Kombination mit Amylasen und Hemicellulasen, insbesondere Mannanasen oder Xylanasen, erfindungsgemäße Enzyme in Kombination mit Amylasen und Xanthanasen sowie erfindungsgemäße Enzyme in Kombination mit Amylasen und Carrageenasen weisen bevorzugt synergistische Reinigungsleistungen auf. Diese Enzyme sind im Prinzip natürlichen Ursprungs; ausgehend von den natürlichen Molekülen stehen für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln allerdings oftmals verbesserte Varianten zur Verfügung, die entsprechend bevorzugt eingesetzt werden. Wasch- oder Reinigungsmittel enthalten Enzyme vorzugsweise in Gesamtmengen von 1×10^{-6} bis 5 Gew.-% bezogen auf aktives Protein. Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe bekannter Methoden, zum Beispiel dem BCA-Verfahren oder dem Biuret-Verfahren bestimmt werden.

[0240] Unter den Proteasen sind solche vom Subtilisin-Typ bevorzugt. Beispiele hierfür sind die Subtilisine BPN' und Carlsberg sowie deren weiterentwickelte Formen, die Protease P692, die Subtilisine 147 und 309, die Alkalische Protease aus *Bacillus lentus*, Subtilisin DY und die den Subtilinasen, nicht mehr jedoch den Subtilisinen im engeren Sinne zuzuordnenden Enzyme Thermitase, Proteinase K und die Proteasen TW3 und TW7.

[0241] Beispiele für erfindungsgemäß einsetzbare Amylasen sind die α -Amylasen aus *Bacillus licheniformis*, aus *B. amyloliquefaciens*, aus *B. stearothermophilus*, aus *Aspergillus niger* und *A. oryzae* sowie die für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln verbesserten Weiterentwicklungen der vorgenannten Amylasen. Desweiteren sind für diesen Zweck die α -Amylase aus *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) und die Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase) aus *B. agaradherens* (DSM 9948) hervorzuheben.

[0242] Erfindungsgemäß einsetzbar sind weiterhin Lipasen oder Cutinasen, insbesondere wegen ihrer Triglycerid-spaltenden Aktivitäten, 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. Desweiteren sind beispielsweise die Cutinasen einsetzbar, die ursprünglich aus *Fusarium solani pisi* und *Humicola insolens* isoliert worden sind. Einsetzbar sind weiterhin Lipasen, beziehungsweise Cutinasen, deren Ausgangsenzyme ursprünglich aus *Pseudomonas mendocina* und *Fusarium solanii* isoliert worden sind.

[0243] Weiterhin bevorzugt einsetzbar sind Enzyme, die unter dem Begriff Hemicellulasen zusammengefaßt werden. Hierzu zählen Mannanasen, Xanthanlyasen, Pektinlyasen (=Pektinasen), Pektinesterasen, Pektatlyasen, Xyloglucanasen (=Xylanasen), Pullulanasen und β -Glucanasen. Weitere einsetzbare Enzyme sind Carrageenasen sowie Tannasen. Ebenso können in den erfindungsgemäßen Mitteln Perhydrolasen eingesetzt werden.

[0244] Zur Erhöhung der bleichenden Wirkung können erfindungsgemäß weitere Oxidoreduktasen, beispielsweise weitere Oxidasen, Oxygenasen, Katalasen, Peroxidasen, wie Halo-, Chloro-, Bromo-, Lignin-, Glucose- oder Mangan-peroxidasen, Dioxygenasen oder Laccasen (Phenoloxidasen, Polyphenoloxidasen) eingesetzt werden. 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).

[0245] Erfindungsgemäß besonders bevorzugt sind Enzymkombinationen, die eine synergistische Reinigungsleistung des sie enthaltenden Mittels bewirken, bestehend aus erfindungsgemäßen Enzymen in Kombination mit Amylasen, erfindungsgemäßen Enzymen in Kombination mit Lipasen, erfindungsgemäßen Enzymen in Kombination mit Cellulasen, erfindungsgemäßen Enzymen in Kombination mit Hemicellulasen, insbesondere Mannanasen oder Xylanasen, erfindungsgemäßen Enzymen in Kombination mit Xanthanasen sowie erfindungsgemäßen Enzymen in Kombination mit Carrageenasen. Ganz besonders bevorzugt werden erfindungsgemäße Enzyme in synergistischer Weise mit Lipasen, Hemicellulasen, Xanthanasen oder Carrageena-

sen kombiniert.

[0246] Die Enzyme können in jeder nach dem Stand der Technik etablierten Form eingesetzt 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.

[0247] Alternativ können die Enzyme 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.

[0248] Weiterhin ist es möglich, zwei oder mehrere Enzyme zusammen zu konfektionieren, so dass ein einzelnes Granulat mehrere Enzymaktivitäten aufweist.

[0249] Das bzw. die Enzyme können 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. Wasch- oder Reinigungsmittel können zu diesem Zweck zusätzlich Stabilisatoren enthalten, die hinlänglich aus dem Stand der Technik bekannt sind. Erfindungsgemäße Mittel können daher prinzipiell alle bekannten Enzymstabilisatoren enthalten.

[0250] Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter, ohne sie jedoch darauf einzuschränken.

Beispiele

[0251] Alle molekularbiologischen Arbeitsschritte folgen Standardmethoden, wie sie beispielsweise in dem Handbuch von Fritsch, Sambrook und Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbour Laborstorry Press, New York, 1989, oder vergleichbaren einschlägigen Werken angegeben sind. Enzyme und Baukästen (Kits) wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller eingesetzt.

Beispiel 1: Ortsgerichtete Mutagenese

[0252] Die Protease-Varianten wurden durch ortsgerechtere („site-directed“) Mutagenese der alkalischen Protease aus *Bacillus gibsonii* DSM 14391 hergestellt. Es wurde eine übliche Mutagenesemethode verwendet unter Einsatz des „Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit“ des Unternehmens Stratagene (Katalog-Nr. 200518, Stratagene, La Jolla, Ca, USA). Es wurde das Codon für die Aminosäureposition 211 (Nukleotide 631–633) in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 von ATG nach TCT geändert, so dass ein Austausch der Aminosäure Methionin (M) gegen die Aminosäure Serin (S) erfolgt. Alternativ oder in Ergänzung wurde das Codon für die Position 212 (Nukleotide 634–636) in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 von CCT nach AAT geändert, so dass ein Austausch der Aminosäure Prolin (P) gegen die Aminosäure Asparagin (N) erfolgt.

Beispiel 2: Expression der Proteasevarianten

[0253] Die für die jeweilige Protease codierende Nukleinsäure liegt in dem Vektor pAWA22 kloniert vor. 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) mit Standardmethoden transformiert.

[0254] 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-Skimmilch-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, um es auf Korrektheit zu überprüfen. Die gewünschte Proteaseaktivität ist in Kulturüberständen entsprechend verifizierter Klone enthalten und kann bei Bedarf hieraus weiter prozessiert werden.

Beispiel 3: Ermittlung der Waschleistung bei Einsatz in einem handelsüblichen pulverförmigen Waschmittel

[0255] 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 Schokomilch/Ruß auf Baumwolle, C-03

C Kakao, EMPA 112

D Blut/Milch auf Baumwolle, C-5 (044).

[0256] 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.

[0257] 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: Protease gemäß SEQ ID NO. 2 (WO 03/054185), Protease gemäß SEQ ID NO. 2 mit der Aminosäuresubstitution P212N und die alkalische Protease aus *Bacillus lentus* Variante F49 (WO 95/23221).

[0258] Nach dem Waschen wurde der Weißheitsgrad der gewaschenen Textilien gemessen. Die Messung erfolgte an einem Spektrometer Minolta CM508d, Lichtart D65, 10. Das Gerät wurde zuvor mit einem mitgelieferten Weißstandard kalibriert. Die erhaltenen Ergebnisse sind die Differenzremissionen zwischen einem Waschvorgang mit einem Waschmittel enthaltend eine Protease und einem parallel durchgeführten Kontrollwaschgang mit einem Waschmittel ohne Protease. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengestellt. Sie erlauben einen unmittelbaren Rückschluss auf den Beitrag des jeweils enthaltenen Enzyms zur Waschleistung des verwendeten Mittels.

Tabelle 2: Waschergebnisse mit einem pulverförmigen Waschmittel bei 40°C

Anschmutzung	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO. 2 P212N	B. lentus
A	3,7	4,6	1,2
B	8,6	11,1	3,6
C	6,2	6,5	4,1
D	14,5	17,7	8,1

[0259] Die Protease-Variante zeigt an verschiedenen Anschmutzungen, insbesondere an den Anschmutzungen B und D, eine verbesserte Leistung im Vergleich zum Ausgangsmolekül gemäß SEQ ID NO. 2 und im Vergleich mit der im Stand der Technik etablierten Protease aus *Bacillus lentus*.

Beispiel 4: Ermittlung der Waschleistung bei Einsatz in einem handelsüblichen flüssigen Waschmittel

[0260] Die Versuchsdurchführung erfolgte im Wesentlichen wie in Beispiel 3 beschrieben. Dabei wurden folgende Anschmutzungen und Textilien verwendet:

A Gras auf Baumwolle, EMPA 164

B Ganzei/Ruß auf Baumwolle, 10N

C Schokomilch/Ruß auf Baumwolle, C-03

D Blut/Milch auf Baumwolle, C-5 (044).

[0261] 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 Stadtwater mit einer Wasserhärte von etwa 16° deutscher Härte gewaschen.

[0262] 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% FASOS, 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: Protease gemäß SEQ ID NO. 2 (WO 03/054185), Protease gemäß SEQ ID NO. 2 mit der Aminosäuresubstitution M211S und die alkalische Protease, die unter dem Handelsnamen Purafect Prime® von dem Unternehmen Genencor International vertrieben wird.

[0263] Nach dem Waschen wurde der Weißheitsgrad der gewaschenen Textilien gemessen. Die Messung erfolgte an einem Spektrometer Minolta CM508d, Lichtart D65, 10. Das Gerät wurde zuvor mit einem mitgelieferten Weißstandard kalibriert. Die erhaltenen Ergebnisse sind die Differenzremissionen zwischen einem Waschvorgang mit einem Waschmittel enthaltend eine Protease und einem parallel durchgeführten Kontrollwaschgang mit einem Waschmittel ohne Protease. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 3 zusammengestellt. Sie erlauben einen unmittelbaren Rückschluss auf den Beitrag des jeweils enthaltenen Enzyms zur Waschleistung des verwendeten Mittels.

Tabelle 3: Waschergebnisse mit einem flüssigen Waschmittel bei 40°C

Anschmutzung	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO. 2 M211S	Purafect Prime
A	2,7	5,5	3,2
B	8,6	11,1	3,0
C	4,1	7,9	8,1
D	16,6	26,1	15,2

[0264] Die Protease-Variante zeigt an verschiedenen Anschmutzungen, insbesondere an den Anschmutzungen A, B und D, eine deutlich verbesserte Leistung im Vergleich zum Ausgangsmolekül gemäß SEQ ID NO. 2 und im Vergleich mit der im Stand der Technik etablierten Protease Purafect Prime.

Beschreibung der Figuren

[0265] [Fig. 1](#): Alignment der erfindungsgemäßen reifen Ausgangsprotease (SEQ ID NO. 2) mit Proteasen aus dem Stand der Technik, errechnet mit dem Programm Vector NTI Suite Ver. 7 (Fa. InforMax, Inc. Bethesda, USA) unter Standardparametern (angegeben ist jeweils das reife (mature) Enzym).

Darin bedeuten:

SEQ ID NO. 2:	Erfindungsgemäße Ausgangsprotease gemäß SEQ ID NO. 2 (reifes Enzym)
BLAP:	Alkalische Protease aus <i>Bacillus lentus</i> DSM 5483 (WO 92/21760 A1) gemäß SEQ ID NO. 3
Subtilisin 309:	Subtilisin 309 gemäß SEQ ID NO. 4

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

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

Zitierte Patentliteratur

- WO 95/07991 A2 [0006]
- WO 95/29979 A1 [0006]
- WO 96/28566 A2 [0007]
- EP 283075 A2 [0008]
- WO 94/02618 A1 [0008, 0009]
- EP 328229 A1 [0008]
- GB 1243784 A [0009]
- WO 95/30011 A2 [0009, 0009]
- WO 91/02792 A1 [0010]
- WO 92/21760 A1 [0010, 0055, 0265]
- WO 95/23221 A1 [0010, 0010, 0055]
- WO 02/088340 A2 [0010]
- WO 03/038082 A2 [0010]
- US 5691295 [0010]
- US 5801039 [0010]
- US 5855625 [0010]
- US 6197589 B1 [0010]
- WO 03/054185 [0012, 0257, 0262]
- WO 00/09679 A1 [0040]
- WO 02/088340 [0055]
- WO 95/23221 [0257]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- „Subtilases: Subtilisin-like Proteases" von R. Siezen, Seite 75–95 in „Subtilisin enzymes", herausgegeben von R. Bott und C. Betzel, New York, 1996 [0002]
- Vasantha et al. (1984) in J. Bacteriol., Volume 159, S. 811–819 [0006]
- J. A. Wells et al. (1983) in Nucleic Acids Research, Volume 11, S. 7911–7925 [0006]
- Publikationen von E. L. Smith et al. (1968) in J. Biol. Chem., Volume 243, S. 2184–2191 [0007]
- Jacobs et al. (1985) in Nucl. Acids Res., Band 13, S. 8913–8926 [0007]
- <http://www.dsmz.de> [0012]
- D. J. Lipman und W. R. Pearson (1985) in Science, Band 227, S. 1435–1441 [0033]
- StEP-Methode (Zhao et al. (1998), Nat. Biotechnol., Band 16, S. 258–261) [0040]
- Random priming recombination (Shao et al., (1998), Nucleic Acids Res., Band 26, S. 681–683) [0040]
- DNA-Shuffling (Stemmer, W. P. C. (1994), Nature, Band 370, S. 389–391) [0040]
- RACHITT (Coco, W. M. et al. (2001), Nat. Biotechnol., Band 19, S. 354–359) [0040]
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 2001: Molecular cloning: a laboratory manual, 3. Edition (Cold Spring Laboratory Press) [0070]
- „Industrial enzymes and their applications" von H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998 [0109]
- T. Egelrud et al., Acta Derm. Venerol., Band 71 (1991), S. 471–474 [0147]
- „Industrial enzymes and their applications" von H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998 [0149]
- Fritsch, Sambrook und Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989 [0251]
- Bernhard et al. (1978), J. Bacteriol., Band 133 (2), S. 897–903 [0253]
- Kawamura und Doi (1984), J. Bacteriol., Band 160 (1), S. 442–444 [0253]

Patentansprüche

1. Protease umfassend eine Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz mindestens zu 78,5% identisch ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 oder Position 212 oder an den Positionen 211 und 212 eine im Vergleich zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäure veränderte Aminosäure aufweist.

2. Protease nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zunehmend bevorzugt zu mindestens 80%, 82,5%, 85%, 87,5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 99,25% identisch ist.

3. Protease nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease ausgewählt ist aus
d) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 eine Aminosäure aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin

e) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 212 eine Aminosäure aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin

f) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 eine Aminosäure gemäß Merkmal a) aufweist und an Position 212 eine Aminosäure gemäß Merkmal b) aufweist.

4. Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease ausgewählt ist aus

a) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 einen Serinrest aufweist

b) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 212 einen Asparaginrest aufweist

c) einer Protease, die in der Zählweise gemäß SEQ ID NO. 2 an Position 211 einen Serinrest und an Position 212 einen Asparaginrest aufweist.

5. Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens eine und zunehmend bevorzugt zwei, drei oder vier übereinstimmende antigene Determinanten mit einer der in den Ansprüchen 1 bis 4 bezeichneten Protease aufweist.

6. Protease, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Ausgangsmolekül erhaltbar ist durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 266 und zunehmend bevorzugt mindestens 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60 und 50 zusammenhängenden Aminosäurepositionen mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt.

7. Protease, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als Ausgangsmolekül erhaltbar ist und einen oder mehrere weitere Aminosäureaustausche in Positionen aufweist, die 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, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 und 268 der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* gemäß SEQ ID NO. 3 in einem Alignment zugeordnet sind.

8. Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich stabilisiert ist, vorzugsweise durch kovalente Kopplung an ein Polymer.

9. Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens eine chemische Modifikation aufweist.

10. Nukleinsäuremolekül, kodierend für eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

11. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz zunehmend bevorzugt zu mindestens 78,5%, 80%, 82,5%, 85%, 87,5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 99,25% identisch ist.

12. Vektor enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 10 oder 11.
13. Vektor nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass er Klonierungsvektor oder ein Expressionsvektor ist.
14. Nicht menschliche Wirtszelle, die eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder ein Fragment derselben beinhaltet oder die zu deren Herstellung angeregt werden kann, vorzugsweise unter Einsatz eines Vektors gemäß Anspruch 12 oder 13.
15. Wirtszelle nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Protease oder ein Fragment derselben in das die Wirtszelle umgebende Medium sezerniert.
16. Wirtszelle nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Bakterium ist.
17. Wirtszelle nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen von Escherichia, Klebsiella, Bacillus, Staphylococcus, Corynebakterium, Arthrobacter, Streptomyces, Stenotrophomonas und Pseudomonas.
18. Wirtszelle nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium ausgewählt ist aus der Gruppe von Escherichia coli, Klebsiella planticola, Bacillus licheniformis, Bacillus lentus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus alcalophilus, Bacillus globigii gibsonii, Bacillus pumilus, Staphylococcus carnosus, Corynebacterium glutamicum, Arthrobacter oxidans, Streptomyces lividans, Streptomyces coelicolor und Stenotrophomonas maltophilia.
19. Wirtszelle nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Zellkern besitzt.
20. Verfahren zur Herstellung einer Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
21. Verfahren nach Anspruch 20 unter Einsatz einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 10 oder 11, vorzugsweise unter Einsatz eines Vektors nach einem der Ansprüche 12 oder 13, besonders bevorzugt unter Einsatz einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 14 bis 19.
22. Mittel, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 9 enthält.
23. Mittel nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Waschmittel, Handwaschmittel, Spülmittel, Handgeschirrspülmittel, Maschinengeschirrspülmittel, Reinigungsmittel, Zahnprothesen- oder Kontaktlinsenpflegemittel, Nachspülmittel, Desinfektionsmittel, kosmetisches Mittel, pharmazeutisches Mittel oder ein Mittel zur Behandlung von Filtermedien, Textilien, Pelzen, Papier, Fellen oder Leder, ist.
24. Mittel nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Wäschewaschmittel oder ein Geschirrspülmittel ist.
25. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass es als Einkomponentensystem vorliegt.
26. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass es in mehrere Komponenten aufgeteilt ist.
27. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass es die Protease in einer Menge von 2 µg bis 20 mg, vorzugsweise von 5 µg bis 17,5 mg, besonders bevorzugt von 20 µg bis 15 mg und ganz besonders bevorzugt von 50 µg bis 10 mg pro g des Mittels enthält.
28. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass es in fester Form vorliegt.
29. Mittel nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass es als rieselfähiges Pulver mit einem Schüttgewicht von 300 g/l bis 1200 g/l, insbesondere 500 g/l bis 900 g/l, vorliegt.
30. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass es in pastöser oder flüssiger Form vorliegt.

31. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für die Protease undurchlässigen Substanz umhüllt ist.

32. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 31, ferner umfassend eines oder mehrere weitere Enzyme.

33. Mittel nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein weiteres Enzym eine Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, β -Glucosidase, Carrageenase, Oxidase, Oxidoreduktase oder eine Lipase ist.

34. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass es 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, Antistatika, Perlglanzmitteln und Hautschutzmitteln.

35. Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 34, ferner umfassend

– 5 Gew.-% bis 70 Gew.-%, insbesondere 5 Gew.-% bis 30 Gew.-% Tenside und/oder

– 10 Gew.-% bis 65 Gew.-%, insbesondere 12 Gew.-% bis 60 Gew.-% wasserlösliches oder wasserdispergierbares anorganisches Buildermaterial und/oder

– 0,5 Gew.-% bis 10 Gew.-%, insbesondere 1 Gew.-% bis 8 Gew.-%, wasserlösliche organische Buildersubstanzen und/oder

– 0,01 bis 15 Gew.-% feste anorganische und/oder organische Säuren beziehungsweise saure Salze und/oder

– 0,01 bis 5 Gew.-% Komplexbildner für Schwermetalle und/oder

– 0,01 bis 5 Gew.-% Vergrauungsinhibitor und/oder

– 0,01 bis 5 Gew.-% Farbübertragungsinhibitor und/oder

– 0,01 bis 5 Gew.-% Schauminhibitor

36. Mittel nach Anspruch 35, ferner umfassend von 0,01 bis 5 Gew.-% optische Aufheller.

37. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 22 bis 36 zur Entfernung von protease-sensitiven Anschmutzungen auf Textilien oder harten Oberflächen.

38. Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein Mittel nach einem der Ansprüche 22 bis 36 angewendet ist.

39. Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 10 proteolytisch aktiv ist.

40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease in einer Menge von 40 μ g bis 4 g, vorzugsweise von 50 μ g bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 μ g bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 μ g bis 1 g pro Anwendung eingesetzt ist.

41. Verwendung einer Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen.

42. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die Protease in einer Menge von 40 μ g bis 4 g, vorzugsweise von 50 μ g bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 μ g bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 μ g bis 1 g pro Anwendung eingesetzt ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

1		70
SEQ ID NO.2	(1)	QQTVPWGITRVQAPTVHNRGITGSGVKVAILDGTGIAQHSDLTIRGGASFVPGESTTADLNGHGHVAGTV
BLAP	(1)	AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDGTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNHGHVAGTI
Subtilisin 309 (269)	(1)	AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDGTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNHGHVAGTI
		71
SEQ ID NO.2	(71)	AALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYA
BLAP	(71)	AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGADGRGAISSIAQGLEWAGNNGMHVANI SLGSPSPSATLEQAVNSA
Subtilisin 309 (269)	(71)	AALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANI SLGSPSPSATLEQAVNSA
		141
SEQ ID NO.2	(141)	TSRGLVIAATGNNGTGSIGYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYGTGIDIVAPGVGIQSTYLLNNSYAS
BLAP	(141)	TSRGLVVAASGNSGASSISYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPPGSTYAS
Subtilisin 309 (269)	(141)	TSRGLVVAASGNSGASSISYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPPGSTYAS
		210
SEQ ID NO.2	(211)	MPGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNADAATR
BLAP	(211)	LNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSSGLVNAEAAATR
Subtilisin 309 (269)	(211)	LNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSSGLVNAEAAATR
		269