

(19)



(11)

**EP 4 098 730 A1**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**07.12.2022 Patentblatt 2022/49**

(51) Internationale Patentklassifikation (IPC):  
**C11D 3/386<sup>(2006.01)</sup> C11D 3/20<sup>(2006.01)</sup>**

(21) Anmeldenummer: **22176672.8**

(52) Gemeinsame Patentklassifikation (CPC):  
**C11D 3/38663; C11D 3/2034; C11D 3/2068**

(22) Anmeldetag: **01.06.2022**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB  
 GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO  
 PL PT RO RS SE SI SK SM TR**  
 Benannte Erstreckungsstaaten:  
**BA ME**  
 Benannte Validierungsstaaten:  
**KH MA MD TN**

(72) Erfinder:

- **DEGERING, Christian**  
40699 Erkrath (DE)
- **AMRAOUI, Marwa**  
40591 Düsseldorf (DE)
- **SCHMELING, Marianne**  
41352 Korschenbroich (DE)
- **WIELAND, Susanne**  
41541 Zons/Dormagen (DE)

(30) Priorität: **02.06.2021 DE 102021114332**

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

(74) Vertreter: **Viering, Jentschura & Partner mbB**  
**Patent- und Rechtsanwälte**  
**Hamborner Straße 53**  
**40472 Düsseldorf (DE)**

(54) **STABILISIERUNG VON ENZYMEN DURCH PHENOXYETHANOL**

(57) Die Erfindung betrifft eine Zusammensetzung enthaltend mindestens eine Peroxidase und Phenoxyethanol. Ferner betrifft die Erfindung ein Wasch- oder Reinigungsmittel umfassend die erfindungsgemäße Zusammensetzung sowie die Verwendung von Phenoxyethanol zur Stabilisierung von Enzymen.

**EP 4 098 730 A1**

## Beschreibung

- 5 **[0001]** Die Erfindung betrifft eine Zusammensetzung enthaltend mindestens eine Peroxidase und Phenoxyethanol. Ferner betrifft die Erfindung ein Wasch- oder Reinigungsmittel umfassend die erfindungsgemäße Zusammensetzung sowie die Verwendung von Phenoxyethanol zur Stabilisierung von Enzymen.
- [0002]** Bei der Produktion von Wasch- oder Reinigungsmitteln werden verschiedene technische Geräte eingesetzt, um definierte Mengen von Rohstoffen zu dosieren. Wenn ein bestimmter Rohstoff in besonders kleinen Volumina dosiert werden soll, kann das problematisch sein, weil die verwendeten Anlagen darauf möglicherweise nicht ausgelegt sind.
- 10 **[0003]** Deshalb ist es grundsätzlich wünschenswert, mehrere Rohstoffe zu kombinieren und für einige Wochen lagerfähig zu halten, damit weniger Dosierstationen benötigt werden und größere Volumina eingesetzt werden können.
- [0004]** Insbesondere bei Enzymen führt eine Verdünnung häufig zur Instabilität der Enzyme über die Zeit. Somit müssen entweder teure und sensitive Dosierstationen angeschafft werden, um die sehr geringen Mengen der Enzyme zu einem Reinigungsmittel hinzuzufügen, oder es werden den verdünnten Enzymrohmaterialien Lösungsmittel wie beispielsweise Glycerin oder Propylenglykol (PG) zugesetzt, um die Enzymstabilität zu erhöhen.
- 15 **[0005]** Nun haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung überraschenderweise herausgefunden, dass die Stabilität von Enzymen, insbesondere Peroxidasen, durch die Zugabe von Phenoxyethanol, insbesondere in wässrigen Zusammensetzungen, deutlich verbessert werden kann.
- [0006]** Deshalb betrifft die Erfindung in einem ersten Aspekt eine Zusammensetzung enthaltend mindestens eine Peroxidase und Phenoxyethanol.
- 20 **[0007]** In bevorzugten Ausführungsformen umfasst oder besteht die mindestens eine Peroxidase aus einer Katalase.
- [0008]** In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Wasch- oder Reinigungsmittel, umfassend die erfindungsgemäße Zusammensetzung.
- [0009]** Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung von Phenoxyethanol zur Stabilisierung mindestens eines Enzyms.
- 25 **[0010]** Diese und weitere Aspekte, Merkmale und Vorteile der Erfindung werden für den Fachmann aus dem Studium der folgenden detaillierten Beschreibung und der Ansprüche ersichtlich. Dabei kann jedes Merkmal aus einem Aspekt der Erfindung in jedem anderen Aspekt der Erfindung eingesetzt werden. Beispielsweise können Merkmale oder Ausführungsformen, die im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung beschrieben werden, auch für das Wasch- oder Reinigungsmittel oder für die Verwendung herangezogen werden. Ferner ist es selbstverständlich, dass die hierin enthaltenen Beispiele die Erfindung beschreiben und veranschaulichen sollen, diese aber nicht einschränken und insbesondere die Erfindung nicht auf diese Beispiele beschränkt ist.
- 30 **[0011]** "Mindestens ein", wie hierin verwendet, bezieht sich auf 1 oder mehr, beispielsweise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder mehr. Bezogen auf einen Inhaltsstoff bezieht sich die Angabe auf die Art des Inhaltsstoffes und nicht auf die absolute Zahl der Moleküle. "Mindestens eine Peroxidase" bedeutet somit beispielsweise mindestens eine Art von Peroxidase, d.h. dass eine Art von Peroxidase oder eine Mischung mehrerer verschiedener Peroxidasen gemeint sein kann. Zusammen mit Prozentangaben bezieht sich die Angabe auf alle Verbindungen der angegebenen Art, die in der Zusammensetzung enthalten sind, d.h. dass die Zusammensetzung über die angegebene Menge der entsprechenden Verbindungen hinaus keine weiteren Verbindungen dieser Art enthält.
- 35 **[0012]** Alle Prozentangaben sind, sofern nicht anders angegeben, Volumenprozent (Vol.-%), jeweils bezogen auf das Gesamtvolumen der entsprechenden Zusammensetzung.
- [0013]** Numerische Bereiche, die in dem Format "in/von x bis y" angegeben sind, schließen die genannten Werte ein. Wenn mehrere bevorzugte numerische Bereiche in diesem Format angegeben sind, ist es selbstverständlich, dass alle Bereiche, die durch die Kombination der verschiedenen Endpunkte entstehen, ebenfalls erfasst werden.
- 40 **[0014]** Zahlenwerte, die hierin ohne Dezimalstellen angegeben sind, beziehen sich jeweils auf den vollen angegebenen Wert mit einer Dezimalstelle. So steht beispielsweise "99 %" für "99,0 %".
- [0015]** Der Ausdruck "ungefähr" oder "etwa", in Zusammenhang mit einem Zahlenwert, bezieht sich auf eine Varianz von  $\pm 10$  % bezogen auf den angegebenen Zahlenwert, bevorzugt  $\pm 5$  %, besonders bevorzugt  $\pm 1$  %.
- [0016]** Der Ausdruck "im Wesentlichen frei von" bedeutet, dass die jeweilige Komponente grundsätzlich in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung enthalten sein kann, dann allerdings in einer Menge vorliegt, die deutlich unterhalb der üblicherweise für die Funktion dieser Komponente erforderlichen oder eingesetzten Menge liegt. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird daher unter der Eigenschaft "im Wesentlichen frei von" einer bestimmten Komponente bevorzugt eine Gesamtmenge von unter 1 Gew.-%, stärker bevorzugt unter 0,1 Gew.-%, noch stärker bevorzugt unter 0,01 Gew.-%, noch bevorzugter unter 0,001 Gew.-%, insbesondere frei, d.h. unter der Nachweisgrenze, von dieser, bezogen auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung, angesehen. Es kann auch bedeuten, dass die entsprechende Komponente nicht bewusst hinzugefügt wurde.
- 55 **[0017]** Die Erfindung betrifft in einem ersten Aspekt eine Zusammensetzung enthaltend mindestens eine Peroxidase und Phenoxyethanol.
- [0018]** Vorzugsweise umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung, bezogen auf das Gesamtgewicht der Zu-

sammensetzung, 0,01 bis 5 Gew.-%, stärker bevorzugt 0,025 bis 3 Gew.-%, beispielsweise 0,25 bis 2,5 Gew.-%, 0,125 bis 1,25 Gew.-% oder 0,03125 bis 0,3125 Gew.-% Aktivenzymgehalt, d.h. der mindestens einen Peroxidase.

**[0019]** In bevorzugten Ausführungsformen umfasst oder besteht die mindestens eine Peroxidase aus einer Katalase.

**[0020]** Vorzugsweise wird die Peroxidase als Enzymflüssigformulierung eingesetzt, beispielsweise als vorkonfektionierte Flüssigzubereitung, wie sie kommerziell erhältlich sind. Hierbei kann sie in geeigneten Pufferlösungen oder Wasser vorliegen. Die Peroxidase kann ferner zusammen mit Begleitstoffen oder Rückständen aus der Fermentation formuliert oder konfektioniert sein. Beispiele hierfür sind Lösungsmittelreste, Puffersubstanzen, Salze, pH-Stellmittel oder Enzymstabilisatoren, ohne darauf beschränkt zu sein. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Peroxidase im Wesentlichen frei von Rückständen aus der Fermentation.

**[0021]** Die Peroxidase kann mittels bekannter Techniken wie beispielsweise der Affinitätschromatographie oder Größenausschlusschromatographie gereinigt worden sein oder beispielsweise als Rohzellextrakt vorliegen.

**[0022]** Typischerweise liegt das Enzym in freier Form vor, kann aber auch mittels bekannter Techniken immobilisiert (räumlich fixiert) sein, beispielsweise mittels kovalenter Bindung an die Oberfläche eines Trägers oder Quervernetzung, ohne darauf beschränkt zu sein.

**[0023]** Weiterhin ist es möglich, dass die Zusammensetzung neben der mindestens einen Peroxidase ein oder mehrere weitere Enzyme umfasst. Beispielsweise können ein oder mehrere weitere Enzyme zusammen mit der Peroxidase formuliert/konfektioniert sein.

**[0024]** Geeignete weitere Enzyme sind beispielsweise auswählbar aus der Gruppe bestehend aus Amylasen, Proteasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Lipasen, Oxidoreduktasen oder Mischungen dieser Enzyme, ohne darauf beschränkt zu sein. Bei der/den Amylase(n) handelt es sich vorzugsweise um eine  $\alpha$ -Amylase. Bei der Hemicellulase handelt es sich vorzugsweise um eine  $\beta$ -Glucanase, eine Pektinase, eine Pullulanase und/oder eine Mannanase. Bei der Cellulase handelt es sich vorzugsweise um ein Cellulase-Gemisch oder eine Einkomponenten-Cellulase, vorzugsweise bzw. überwiegend um eine Endoglucanase und/oder eine Cellobiohydrolase. Bei der Oxidoreduktase handelt es sich vorzugsweise um eine Oxidase, insbesondere eine Cholin-Oxidase, oder um eine Perhydrolase. Die genannten Enzyme können alle wie oben für die Peroxidasen beschrieben formuliert/konfektioniert sein.

**[0025]** In bevorzugten Ausführungsformen ist die erfindungsgemäße Zusammensetzung eine wässrige Zusammensetzung. Vorzugsweise umfasst die Zusammensetzung 0,5 bis 99,99 Vol.-%, stärker bevorzugt 0,5 bis 99,9 Vol.-%, noch stärker bevorzugt 0,5 bis 99,5 Vol.-%, noch stärker bevorzugt 0,5 bis 99 Vol.-%, noch stärker bevorzugt 0,5 bis 98 Vol.-%, noch stärker bevorzugt 0,5 bis 97 Vol.-%, noch stärker bevorzugt 1 bis 96 Vol.-% Wasser, beispielsweise ungefähr 1 bis 74 Vol.-%, 40 bis 74 Vol.-%, 1 bis 75 Vol.-%, 40 bis 75 Vol.-%, 1 bis 85 Vol.-%, 50 bis 85 Vol.-%, 1 bis 87 Vol.-%, 50 bis 87 Vol.-%, 1 bis 88 Vol.-%, 50 bis 88 Vol.-%, 60 bis 96 Vol.-%, 60 bis 97 Vol.-%, 60 bis 98 Vol.-%, 60 bis 99 Vol.-%, 65 bis 99,5 Vol.-%, 70 bis 99,9 Vol.-% oder 75 bis 99,99 Vol.-% bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung. Die Mengenangaben können sich alternativ auch auf Gew.-% bezogen auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung beziehen. Es können in der Zusammensetzung verschiedene Puffersubstanzen, d.h. insbesondere als Puffer geeignete Salze enthalten sein. Ferner ist es möglich, dass der Zusammensetzung neben dem Wasser weitere (organische) Lösungsmittel zugesetzt werden.

**[0026]** Die eingesetzte Peroxidase kann ein natürlicherweise vorkommendes Enzym sein oder ein Enzym, das auf Basis natürlich vorkommender Enzyme durch eine oder mehrere Mutationen verändert wurde, um gewünschte Eigenschaften, wie beispielsweise katalytische Aktivität, Stabilität oder Reinigungsleistung, positiv zu beeinflussen. Beispielsweise kann ein genetisch verändertes Enzym mindestens 70 %, mindestens 75 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 %, mindestens 98 % oder 100 % Sequenzidentität mit einem natürlich vorkommenden Ausgangsenzym über die gesamte Länge des Ausgangsproteins aufweisen. In verschiedenen Ausführungsformen kann die katalytische Aktivität eines genetisch veränderten Enzyms mindestens 70%, mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 85%, mindestens 90%, mindestens 95%, mindestens 98% oder 100% der katalytischen Aktivität ihres Ausgangsenzyms betragen.

**[0027]** Die in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung umfassten Enzyme können aus verschiedenartigen Organismen stammen. Geeignete Mikroorganismen sind beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen von Escherichia, Klebsiella, Bacillus, Staphylococcus, Corynebakterium, Arthrobacter, Streptomyces, Ste-notrophomonas und Pseudomonas, ohne darauf beschränkt zu sein.

**[0028]** Die in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung umfassten Enzyme können aber auch aus Eukaryonten stammen. Beispiele dafür sind Pilze, wie Actinomyceten, oder Hefen, wie Saccharomyces oder Kluyveromyces. In verschiedenen Ausführungsformen können die eingesetzten Enzyme aus Pilzen, insbesondere filamentösen Pilzen, beispielsweise solchen der Gattung Trichoderma, stammen.

**[0029]** Besonders bevorzugt umfasst die mindestens eine Peroxidase der erfindungsgemäßen Zusammensetzung eine Katalase. Eine erfindungsgemäß einsetzbare Katalase ist beispielsweise kommerziell von Novozymes erhältlich. Besonders bevorzugt ist die unter dem Handelsnamen Terminox Supreme 1000 BCU von Novozymes erhältliche Katalase.

**[0030]** In bevorzugten Ausführungsformen wird die mindestens eine Peroxidase, insbesondere die mindestens eine

Katalase, die üblicherweise in einer Enzymflüssigformulierung vorformuliert vorliegen kann, mit Wasser gemischt, um eine wässrige Zusammensetzung gemäß der Erfindung zu erhalten. In einer Ausführungsform kann das Phenoxyethanol dem zur Verdünnung eingesetzten Wasser bereits zugesetzt sein. Alternativ kann das Phenoxyethanol anschließend zu der wässrigen Zusammensetzung gegeben werden, sodass die mindestens eine Peroxidase und Phenoxyethanol in der wässrigen Zusammensetzung vorliegen.

**[0031]** In bevorzugten Ausführungsformen liegt eine Verdünnung einer vorformulierten Peroxidaseflüssigzubereitung vor, beispielsweise durch die Zugabe von Wasser oder Puffer, wobei die vorformulierte Peroxidaseflüssigzubereitung in einer Menge von 1 bis 50 Vol.-%, insbesondere 2 bis 30 Vol.-%, beispielsweise ungefähr 2,5 Vol.-%, 3,125 Vol.-%, 5 Vol.-%, 10 Vol.-%, 12,5 Vol.-%, 15 Vol.-%, 20 Vol.-%, 25 Vol.-% oder 30 Vol.-% eingesetzt wird. In verschiedenen Ausführungsformen enthält die erfindungsgemäße, ggf. verdünnte, Zusammensetzung die Peroxidase in einer Menge von 0,01 bis 5 Gew.-%, vorzugsweise 0,025 bis 3 Gew.-%, beispielsweise 0,25 bis 2,5 Gew.-%, 0,125 bis 1,25 Gew.-% oder 0,03125 bis 0,3125 Gew.-% Aktivenzymgehalt, bezogen auf das Gesamtgewicht der erfindungsgemäßen Zusammensetzung.

**[0032]** In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung, bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung, Phenoxyethanol in einer Menge von 0,01 bis 10 Vol.-%, bevorzugt von 0,1 bis 5 Vol.-%, insbesondere von 0,5 bis 2 Vol.-%, beispielsweise von 0,9 Vol.-%. Diese Mengenangaben können sich alternativ auch auf Gewichts-% relativ zum Gesamtgewicht beziehen.

**[0033]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung, insbesondere die wässrige Zusammensetzung, mindestens eine Katalase und Phenoxyethanol.

**[0034]** In bevorzugten Ausführungsformen können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen weitere Additive umfassen.

**[0035]** Geeignete Additive sind beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, auswählbar aus Tensiden, Gerüststoffen, Bleichmitteln, Bleichkatalysatoren, Bleichaktivatoren, Elektrolyten, pH-Stellmitteln, Parfümen, Parfümträgern, Fluoreszenzmitteln, Farbstoffen, Hydrotropen, Komplexbildnern, Schauminhibitoren, Silikonölen, Soil-Release-Polymeren, Vergrauungsinhibitoren, Einlaufverhinderern, Knitterschutzmitteln, antimikrobiellen Wirkstoffen, Germiziden, Fungiziden, Antioxidantien, Korrosionsinhibitoren, Antistatika, Bittermitteln, Bügelhilfsmitteln, Phobier- und Imprägniermitteln, Hautpflegenden Wirkstoffen, Quell- und Schiebefestmitteln, weichmachenden Komponenten sowie UV-Absorbern und Mischungen daraus.

**[0036]** In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Wasch- oder Reinigungsmittel, umfassend die erfindungsgemäße Zusammensetzung.

**[0037]** Die allgemeine Herstellung und Zusammensetzung von Wasch- und Reinigungsmitteln ist dem Fachmann auf diesem Gebiet grundsätzlich bekannt.

**[0038]** Beispielhafte Wasch- und Reinigungsmittelzusammensetzungen sowie geeignete Inhaltsstoffe werden zum Beispiel in der WO 01/44433 A1 oder WO 2016/091650 A1 beschrieben.

**[0039]** Schließlich betrifft die Erfindung in einem weiteren Aspekt die Verwendung von Phenoxyethanol zur Stabilisierung mindestens eines Enzyms.

**[0040]** "Stabilisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung vorzugsweise eine reduzierte Abnahme der anfänglichen Enzymaktivität über die Zeit. Typischerweise nimmt die Enzymaktivität über die Zeit immer weiter ab. Die Stabilisierung mittels Phenoxyethanol führt insbesondere dazu, dass diese Abnahme verlangsamt wird.

**[0041]** In verschiedenen Ausführungsformen erfolgt die Stabilisierung des Enzyms in einer wässrigen Lösung. Vorzugsweise umfasst die wässrige Lösung 0,5 bis 99,99 Vol.-%, stärker bevorzugt 0,5 bis 99 Vol.-%, noch stärker bevorzugt 1 bis 96 Vol.-%, beispielsweise ungefähr 1 bis 74 Vol.-%, 40 bis 74 Vol.-%, 1 bis 85 Vol.-%, 50 bis 85 Vol.-%, 1 bis 87 Vol.-% oder 60 bis 96 Vol.-% Wasser oder Pufferlösung, besonders bevorzugt Wasser. Der Lösung können weitere, beispielsweise organische Lösungsmittel, aber auch weitere Inhaltsstoffe, insbesondere Additive für Wasch- oder Reinigungsmittel wie weiter oben beschrieben, zugesetzt sein. Auch Bestandteile, die zusammen mit dem Enzym formuliert oder konfektioniert wurden, können in der wässrigen Lösung enthalten sein. Insbesondere erfolgt die Stabilisierung mindestens eines Enzyms in einem Wasch- oder Reinigungsmittel.

**[0042]** In bevorzugten Ausführungsformen ist das mindestens eine Enzym eine Amylase, Protease, Cellulase, Hemicellulase, Peroxidase, Lipase, Oxidoreduktase oder eine Mischung dieser Enzyme. Vorzugsweise umfasst oder besteht das Enzym aus mindestens einer Peroxidase, insbesondere einer Katalase. Geeignete Organismen, Enzymformulierungen oder-konfektionierungen wurden bereits weiter oben für die erfindungsgemäße Zusammensetzung beschrieben und können hier herangezogen werden.

**[0043]** Vorzugsweise liegt das mindestens eine Enzym, stärker bevorzugt die Peroxidase, insbesondere die Katalase, in einer Menge von 0,01 bis 5 Gew.-%, stärker bevorzugt 0,025 bis 3 Gew.-%, beispielsweise 0,25 bis 2,5 Gew.-%, 0,125 bis 1,25 Gew.-% oder 0,03125 bis 0,3125 Gew.-% Aktivenzymgehalt in der wässrigen Lösung, bezogen auf das Gesamtgewicht der wässrigen Lösung, vor.

**[0044]** In verschiedenen Ausführungsformen liegt Phenoxyethanol in der wässrigen Lösung in einer Menge von 0,01 bis 10 Vol.-%, bevorzugt von 0,1 bis 5 Vol.-%, stärker bevorzugt 0,5 bis 2 Vol.-%, beispielsweise 0,9 Vol.-%, bezogen

auf das Gesamtvolumen der wässrigen Lösung, vor.

**[0045]** In bevorzugten Ausführungsformen ist die wässrige Lösung eine wässrige Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung. Insbesondere kann die wässrige Lösung ein Wasch- oder Reinigungsmittel gemäß der vorliegenden Erfindung sein.

**[0046]** Besonders bevorzugt kann Phenoxyethanol zur Erhöhung der Lagerstabilität von Enzymen, vorzugsweise Peroxidasen, insbesondere Katalasen, in wässrigen Lösungen verwendet werden. Beispielsweise kann die (Lager-)Stabilität für mindestens 12 Wochen erhöht werden. In verschiedenen Ausführungsformen erfolgt die Stabilisierung durch Phenoxyethanol bei Temperaturen zwischen 10 und 41 °C, bevorzugt 20 bis 40 °C, beispielsweise bei Raumtemperatur (ungefähr 20 bis 25 °C), 30 °C oder 40 °C.

**[0047]** Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Beispielen illustriert, ist aber nicht auf diese beschränkt.

Beispiele

**Beispiel 1: Verwendete bioanalytische Methode**

**[0048]**

1. Prinzip:

Im Bestimmungsverfahren reagiert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Gegenwart von Peroxidase mit einem System aus Chromotropsäure und 4-Aminoantipyrin zu einem blauen Farbstoff (D = Chromophor), das Extinktionsmaximum liegt bei 600 nm.



DH<sub>2</sub> = Elektronendonator = Chromogen

D = Chromophor

Die Konzentration des produzierten Farbstoffs (Chromophor) ist proportional zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in der Probe, sowie zur Extinktion. Somit ist für dieses Messverfahren das Lambert-Beer-Gesetz anwendbar (ursprüngliche Methode nach Meattini, 1975). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration kann anhand einer Kalibrierkurve ermittelt werden.

Nach dem Lambert-Beer-Gesetz ist die Extinktion proportional der Schichtdicke und der Konzentration der absorbierenden Substanzen (Chromophor).

2. Durchführung:

Die photometrische Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration wird in Mikrotiterplatten bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Zunächst wird die Enzymlösung mit Substrat und Puffer für 10 Minuten unter Schütteln inkubiert (25 °C). Dann wird die Reaktion durch Zugabe des Katalase-Inhibitors Hydroxylaminsulfat gestoppt und die Farbreaktion durch die Zugabe des Peroxidreagenzes (Chromotropsäure/4-Aminoantipyrin in Phosphatpuffer, pH 6,5) und der Meerrettich-Peroxidase-Lösung (HRP, Sigma Aldrich P8125) eingeleitet. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von Peroxidase. Die Farbentwicklung ist nach ca. einer Minute abgeschlossen, der Farbstoff bleibt über die Dauer von 6 Minuten stabil. Die Extinktion wird nach 3 Minuten als Endpunktbestimmung gemessen (600 nm). Die Verdünnungen der Probenlösungen werden so gewählt, dass die zu bestimmenden Konzentrationen zwischen 10 und 50 nmol Wasserstoffperoxid liegen. Die Messung erfolgt gegen einen Reaktionsansatz mit Puffer als Blindwert.

**Beispiel 2: Verdünnung des Enzymrohmaterials**

**[0049]** Die Katalase (Terminox Supreme 1000 BCU, Novozymes, 10-100 mg/mL Aktivenzymgehalt) wurde mit Wasser auf 25 %, 12,5 % und 3,125 % verdünnt. Beispielsweise entspricht eine 25 %-Katalase-Lösung einer Lösung mit 25 mL Katalase (kommerziell erhältliche Enzymformulierung (Enzymrohmaterial)) und 75 mL Wasser. Zu den Verdünnungen wurden 0,9 % Phenoxyethanol (PHE) hinzugefügt.

**[0050]** Die Katalase, die verdünnten Katalase-Lösungen und die verdünnten Katalase-Lösungen + PHE wurden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Enzymaktivität des Startwertes bei 0 Wochen wurde als 100 % definiert. Die Restaktivität nach der Lagerung über 12 Wochen wurde bestimmt. Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde die unter Beispiel 1 beschriebene bioanalytische Methode verwendet.

Tabelle 1: Übersicht der Enzymaktivitäten nach 12 Wochen bei verschiedenen Temperaturen.

Ansätze	0 Wochen	12 Wochen RT	12 Wochen 30 °C	12 Wochen 40 °C
Katalase (Enzym rohmaterial)	100 %	74%	65 %	73%
25 % Katalase-Lösung	100 %	47%	43 %	29%
25 % Katalase-Lösung + 0,9 % PHE	100 %	88%	73 %	89%
12,5 % Katalase-Lösung	100 %	48%	34 %	11 %
12,5 % Katalase-Lösung + 0,9 % PHE	100 %	75%	68 %	69%
3,125 % Katalase-Lösung	100 %	31 %	13 %	5%
3,125 % Katalase-Lösung + 0,9 % PHE	100 %	74%	67 %	62%

**[0051]** Es werden verfahrensbedingte Abweichungen von 5 bis 10 % erwartet.

**[0052]** Die Verdünnung der kommerziell erhältlichen Enzymformulierung führt zu einer signifikant reduzierten Enzymaktivität. Es wurde überraschend gefunden, dass die Zugabe von 0,9 % PHE zu einer signifikant verbesserten Enzymaktivität bei allen Temperaturen führt, welche der durch die Verdünnung bewirkten Verringerung der Enzymaktivität entgegenwirkt.

#### Patentansprüche

1. Zusammensetzung enthaltend mindestens eine Peroxidase und Phenoxyethanol.
2. Die Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine Peroxidase eine Katalase umfasst oder daraus besteht.
3. Die Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Peroxidase in einer Menge von 0,01 bis 5 Gew.-%, bevorzugt 0,025 bis 3 Gew.-% Aktivenzymgehalt in der Zusammensetzung, bezogen auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung, enthalten ist.
4. Die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei Phenoxyethanol in einer Menge von 0,01 bis 10 Vol.-%, bevorzugt 0,1 bis 5 Vol.-% in der Zusammensetzung, bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung, enthalten ist.
5. Die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Zusammensetzung eine wässrige Zusammensetzung ist und vorzugsweise 0,5 bis 99 Vol.-%, stärker bevorzugt 1 bis 96 Vol.-% Wasser umfasst.
6. Wasch- oder Reinigungsmittel umfassend die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
7. Verwendung von Phenoxyethanol zur Stabilisierung mindestens eines Enzyms.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Stabilisierung in einer wässrigen Lösung erfolgt.
9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8 zur Stabilisierung eines Enzyms in einem Wasch- oder Reinigungsmittel.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei das mindestens eine Enzym eine Amylase, Protease, Cellulase, Hemicellulase, Peroxidase, Lipase, Oxidoreduktase oder Mischungen dieser Enzyme, vorzugsweise eine Peroxidase, stärker bevorzugt eine Katalase, umfasst oder daraus besteht.



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 22 17 6672

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	DE 10 2009 045798 A1 (HENKEL AG & CO KGAA [DE]) 5. August 2010 (2010-08-05) * Absatz [0015]; Beispiele *	1-5	INV. C11D3/386 C11D3/20
X	DE 199 43 392 A1 (INST DR SCHRADER CREACHEM GMBH [DE]) 15. März 2001 (2001-03-15) * Beispiel 1 *	1-5	
X	CN 111 749 023 A (SHENZHEN BROGMI BIOTECHNOLOGY CO LTD) 9. Oktober 2020 (2020-10-09) * Anspruch 8; Beispiele 1-7, 9 *	7-9	
Y		10	
X	US 2014/073036 A1 (HUNT JR CLINTON [US] ET AL) 13. März 2014 (2014-03-13) * Absätze [0076], [0080], [0081]; Anspruch 9 *	1,3-6	
Y		10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			C11D
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>Den Haag</b>		Abschlussdatum der Recherche <b>13. Oktober 2022</b>	Prüfer <b>Loiselet-Taisne, S</b>
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ..... & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

1  
EPO FORM 1503 03.82 (F04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 22 17 6672

5 In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

13-10-2022

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
<b>DE 102009045798 A1</b>	<b>05-08-2010</b>	<b>KEINE</b>	
<b>DE 19943392 A1</b>	<b>15-03-2001</b>	<b>AU 7775200 A</b>	<b>17-04-2001</b>
		<b>DE 19943392 A1</b>	<b>15-03-2001</b>
		<b>WO 0119331 A1</b>	<b>22-03-2001</b>
<b>CN 111749023 A</b>	<b>09-10-2020</b>	<b>KEINE</b>	
<b>US 2014073036 A1</b>	<b>13-03-2014</b>	<b>EP 2893013 A1</b>	<b>15-07-2015</b>
		<b>EP 3470516 A1</b>	<b>17-04-2019</b>
		<b>ES 2715073 T3</b>	<b>31-05-2019</b>
		<b>US 2014073036 A1</b>	<b>13-03-2014</b>
		<b>US 2017321153 A1</b>	<b>09-11-2017</b>
		<b>WO 2014039442 A1</b>	<b>13-03-2014</b>

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE**

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

**In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente**

- WO 0144433 A1 [0038]
- WO 2016091650 A1 [0038]