

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 157560 B

(21) Patentansøgning nr.: 4499/87

(51) Int.Cl.⁵

C 11 D 7/42

(22) Indleveringsdag: 28 aug 1987

C 12 N 9/20

(41) Alm. tilgængelig: 01 mar 1988

(44) Fremlagt: 22 jan 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(83) Deponering af mikroorganismer Udlev.t.exp.

(30) Prioritet: 29 aug 1986 DK 4117/86 09 okt 1986 DK 4816/86

(71) Ansøger: *Novo-Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Ida Birgitte *Huge-Jensen; DK, Erik *Gormsen; DK,

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Enzymatisk detergentadditiv, detergent indeholdende det enzymatiske detergentadditiv og fremgangsmåde til vask af tekstiler.**

(56) Fremdragne publikationer

JP ans.nr. 48-62990 (engelsk oversættelse)

(57) Sammendrag:

4 4 9 9 - 8 7

Lipase afledes af *Humicola* sp. (inkl. *Thermomyces* sp.), fortrinsvis *H. lanuginosa*. Det har vist sig, at denne lipase har høj aktivitet ved alkalisk pH og er kompatibel med anioniske overfladeaktive stoffer, og den er mere effektiv som detergentadditiv end tidligere beskrevne detergentlipaser.

1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35
37
39
41
43
45
47
49
51
53
55
57
59
61
63
65
67
69
71
73
75
77
79
81
83
85
87
89
91
93
95
97
99
101
103
105
107
109
111
113
115
117
119
121
123
125
127
129
131
133
135
137
139
141
143
145
147
149
151
153
155
157
159
161
163
165
167
169
171
173
175
177
179
181
183
185
187
189
191
193
195
197
199
201
203
205
207
209
211
213
215
217
219
221
223
225
227
229
231
233
235
237
239
241
243
245
247
249
251
253
255
257
259
261
263
265
267
269
271
273
275
277
279
281
283
285
287
289
291
293
295
297
299
301
303
305
307
309
311
313
315
317
319
321
323
325
327
329
331
333
335
337
339
341
343
345
347
349
351
353
355
357
359
361
363
365
367
369
371
373
375
377
379
381
383
385
387
389
391
393
395
397
399
401
403
405
407
409
411
413
415
417
419
421
423
425
427
429
431
433
435
437
439
441
443
445
447
449
451
453
455
457
459
461
463
465
467
469
471
473
475
477
479
481
483
485
487
489
491
493
495
497
499
501
503
505
507
509
511
513
515
517
519
521
523
525
527
529
531
533
535
537
539
541
543
545
547
549
551
553
555
557
559
561
563
565
567
569
571
573
575
577
579
581
583
585
587
589
591
593
595
597
599
601
603
605
607
609
611
613
615
617
619
621
623
625
627
629
631
633
635
637
639
641
643
645
647
649
651
653
655
657
659
661
663
665
667
669
671
673
675
677
679
681
683
685
687
689
691
693
695
697
699
701
703
705
707
709
711
713
715
717
719
721
723
725
727
729
731
733
735
737
739
741
743
745
747
749
751
753
755
757
759
761
763
765
767
769
771
773
775
777
779
781
783
785
787
789
791
793
795
797
799
801
803
805
807
809
811
813
815
817
819
821
823
825
827
829
831
833
835
837
839
841
843
845
847
849
851
853
855
857
859
861
863
865
867
869
871
873
875
877
879
881
883
885
887
889
891
893
895
897
899
901
903
905
907
909
911
913
915
917
919
921
923
925
927
929
931
933
935
937
939
941
943
945
947
949
951
953
955
957
959
961
963
965
967
969
971
973
975
977
979
981
983
985
987
989
991
993
995
997
999

Opfindelsen angår et enzymatisk detergentadditiv, hvis aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, et detergent indeholdende sådanne additiver og en fremgangsmåde til vask af tekstiler, ved hvilken et sådan detergent
5 anvendes.

Det område, som omfatter enzymatiske additiver i detergenter, har været i hastig vækst i de sidste årtier. Der kan f.eks. henvises til artiklen "How Enzymes Got into Detergents", bd. 12, Developments in Industrial Microbiology, en
10 publikation fra Society for Industrial Microbiology, American Institute of Biological Sciences, Washington D.C. 1971, af Claus Dambmann, Poul Holm, Villy Jensen og Mogens Hilmer Nielsen, og til P.N. Christensen, K. Thomsen og S. Branner: "Development of Detergent Enzymes", foredrag holdt den 9.
15 oktober 1986 på "The 2nd World Conference on Detergents" i Montreux, Schweiz.

Proteolytisk detergentadditiv anvendes i udstrakt grad i Europa, USA og Japan. I flere lande indeholder størstedelen af detergenterne, både flydende og i pulverform,
20 protease.

Anvendelsen af lipase som et detergentadditiv er kendt. En omfattende oversigt findes i H. Andree et al.: "Lipases as Detergent Components", Journal of Applied Biochemistry, bind 2, 218-229 (1980). Flere eksempler findes i US
25 patentskrift nr. 4,011,169 (spalte 4, linie 65 til spalte 5, linie 68) i GB patentskrift nr. 1,293,613 (side 2, linie 6-29) og i et foredrag af T. Fujii med titlen "Washing of Oil Stains with Lipase" (på japansk), der blev holdt på det 16. Symposium on Washing, der blev afholdt i Tokyo den 17.-18. september
30 1984.

Blandt kendte lipaser, der er anvendt som detergentadditiver, har *Fusarium oxysporum* lipase så vidt vi ved de bedste lipolytiske egenskaber, betragtet ud fra et detergentanvendelsessynspunkt, jfr. europæisk patentansøgning med
35 publikationsnummer 0 130 064, især sammenligningstabellen på side 27.

Hvis vaskeprocessen gennemføres ved høj temperatur og høj alkalinitet, vil størstedelen af det fedtholdige snavs under alle omstændigheder blive fjernet. Vaskeprocesser ved lav eller middel temperatur (ca. 60°C og derunder) anvendes 5 dog nu sædvanligvis, og ved disse lave temperaturer er de kendte lipaser kun i stand til at opløse en del af det fedtholdige smuds.

Hidtil er effektiviteten af lipolytiske detergent-additiver sædvanligvis blevet målt ved hjælp af EMPA-lapper 10 (EMPA er en forkortelse for Eidgenössische Materialprüfungs- und Versuchsanstalt, St. Gallen, Schweiz) nr. 101 (olivenolie/bomuld) og 102 (olivenolie/uld) ved tillempling af den metode, der er beskrevet i engelsk patentskrift nr. 1.361.386 (især side 4 og 7) og US patentskrift nr. 3.723.250 (især 15 spalte 15-19). På denne måde kan den lipolytiske renservirkning udtrykkes som forskellen i remissionsværdi delta R. Imidlertid blev her anvendt to direkte mål for den lipolytiske renservirkning. For det første blev mængden af restfedt bestemt. Derved vises den kombinerede virkning af detergent og lipase. For 20 det andet blev restfedtet analyseret for tilstedeværelsen af olie (triglycerid) og ned-brydningsprodukter (mono- og diglycerid og fedtsyre), og antallet af ikke-hydrolyserede glyceridbindinger i olien blev beregnet; dette viser lipasevirkningen mere direkte. Ved anvendelse af disse metoder har det 25 vist sig, at selv den bedst kendte detergentlipase udviser en lipolytisk vaskevirkning, som kunne ønskes forbedret.

Endvidere er det kendt, at lipaser, eftersom de er proteiner, har tendens til at blive angrebet af proteaser, og som tidligere nævnt indeholder mange detergenter i dag prote- 30 aser. Der er intet publiceret, som fortæller om detergentlipaser, der har tilfredsstillende stabilitet i tilstedeværelsen af protease. Tværtimod har det vist sig, at nogle kendte detergentlipaser har ringe stabilitet i detergentopløsninger i tilstedeværelsen af almindeligt anvendte detergentproteaser. 35

Der er således behov for et lipolytisk detergent-additiv, der udviser en betydeligt bedre lipolytisk detergent-virkning ved økonomisk rimelige lipaseaktiviteter i vaske-flotten, og som er stabil i detergentopløsninger, der inde-
5 holder detergentprotease.

Opfindelsen angår et lipolytisk detergentadditiv, der er ejendommelig ved, at lipasen kan fremstilles ved hjælp af en stamme af slægten *Humicola*, inklusive slægten *Thermomyces*.

10 Opfindelsen angår endvidere et detergent omfattende ovennævnte lipolytiske detergentadditiv og en fremgangsmåde til vask af tekstiler, der anvender dette detergent ved pH 7-12.

Detergentlipaserne som anvendes ifølge opfindelsen
15 udviser en vaskevirkning, der er langt bedre sammenlignet med tidligere kendte detergentlipaser. Endvidere er de lipaser, som er anvendt i opfindelsen, stabile i detergentopløsning ved tilstedeværelsen af almindeligt anvendte detergentproteaser, modsat kendte detergentlipaser.

20 Det er beskrevet i japansk patentpublikation nr. 48-62990 (ikke prøvet), at *Humicola lanuginosa* er en lipase-producent. Imidlertid nævnes det ikke i denne japanske patent-ansøgning, at *Humicola lanuginosa* lipasen er velegnet som aktiv komponent i et enzymatisk detergentadditiv. Tværtimod
25 fremgår det af fig. 1 i den japanske patentansøgning, at *Humicola lanuginosa* S-38 lipasens pH optimum ligger på ca. 8, og at aktiviteten falder hurtigt når pH-værdien stiger til over 8. Det måtte således forventes, at denne lipase ville være uegnet som detergentadditiv, da pH i vaskeflotter sædvanligvis
30 er langt over 8. Det har dog overraskende vist sig, at *Humicola lanuginosa* S-38 lipasen har et pH optimum langt over 8, se eksempel 1 senere i denne beskrivelse.

Det er endvidere beskrevet i *Current Science*, aug. 5, 1981, bind 50, nr. 15, s. 680, at *Humicola lanuginosa* lipa-
35 sen kan anvendes til kemisk rensning. Da pH optimummet, der udelukkende vedrører vandige medier, er helt uden betydning

for en lipase til kemisk rensning, betyder ovenstående redegørelse intet for egnetheden af *Humicola lanuginosa* lipasen som et lipolytisk detergentadditiv.

Desuden ses det af Agr.Biol.Chem. 37 (11), side 2488
5 (1973), at *H. lanuginosa* lipasen hæmmes meget ved tilsætning af visse anioniske overfladeaktive stoffer. Ifølge vore opdagelser er *H. lanuginosa* lipasen dog overraskende fortrinligt kompatibel med LAS, der er et almindeligt anvendt anionisk overfladeaktivt stof.

10 Fig. 1 - 4 viser pH-aktivitetskurverne, fig. 1 - 2 er for DSM 3819 lipase, og fig. 3 - 4 for DSM 1800 lipase. Fig. 1 og 3 er ved tributyrinmetoden, og fig. 2 og 4 ved olivenolie/PVC-metoden.

Lipaser som anvendes ifølge opfindelsen opnås
15 fortrinsvis fra stammer af termofil *Humicola* sp., inklusive thermophil *Thermomyces* sp., såsom *H. lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce, *H. stellata* Bunce, *H. grisea* var. *thermoidea*, Cooney & Emerson, *H. insolens*, Cooney & Emerson, *Thermomyces ibadanensis*, Apinis & Eggins, *H. hyalothermophila* Moubasher,
20 Mazen og Abdel-Hafez, *H. grisea* var. *indica* Subrahmanyam, *H. brevis* var. *thermoidea* Subrahmanyam og Thirumalachar og *H. brevispora* Subrahmanyam og Thirumalachar.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen kan lipasen fremstilles
25 fra *H. lanuginosa* (Griffon og Maublanc) Bunce, *H. brevispora* Subrahmanyam og Thirumalachar, *H. brevis* var. *thermoidea* Subrahmanyam og Thirumalachar eller *H. insolens* Cooney & Emerson.

H. lanuginosa er endvidere beskrevet under synonymerne *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky, *Sepedonium lanuginosum*
30 Griffon og Maublanc, *Sepedonium thermophilum cyclosporum* og *S. thermophilum ovosporum* Velich, *Acremoniella* sp. Rege, *Acremoniella thermophila* Curzi og *Monotospora lanuginosa* (Griffon og Maublanc) Mason.

Ydermere blev arten Scytalidium thermophilum (Cooney & Emerson) Austwich af Hedger (1975, "The Ecology of thermophilic Fungi in Indonesia", i "Biodegradation et Humification", "Rapport du ler colloque International" - Nancy 1974 (ed. G. Kilbertius, O. Reisinger, A. Mourey & J. A. Cancela Da Fonseca), Sarreguemines: Pierron Editeur - 57206) anset for at tilhøre Humicola insolens.

Lipasen som anvendes ifølge opfindelsen kan fremstilles af en af følgende stammer:

10 taxonomisk			deponerings-
<u>benævnelse</u>	<u>internt Nr.</u>	<u>deponeringsnr.</u>	<u>dato</u>
H. lanuginosa	A 1231	DSM 3819	13. aug 1986
H. lanuginosa	H 126	DSM 4109	4. maj 1987
H. brevispora	A 2121	DSM 4110	4. maj 1987
15 H. brevis var. thermoidea	A 2106	DSM 4111	4. maj 1987
H. insolens	C 579	DSM 1800	1. okt 1981

DSM står for Deutsche Sammlung von Mikroorganismen. Stammerne er deponeret under Budapesttraktatens bestemmelser.

20 Lipase til brug i opfindelsen kan fremstilles ved aerob dyrkning af en af ovenstående stammer i henhold til de i teknikken kendte retningslinier, f.eks. som i de senere angivne eksempler.

pH-afhængigheden af lipaseaktiviteten blev bestemt ved en traditionel metode, hvor tributyrin blev anvendt som substrat ved 30°C i en pH-stat og med gummi arabicum som emulgeringsmiddel. Aktiviteten ved forskellige pH-værdier blev fundet udfra forbruget af alkali overfor tid.

pH-afhængigheden blev også checket med et mere realistisk substrat, nemlig olivenolie, der var adsorberet på PVC (i henhold til US patentskrift 4,284,719).

pH-aktivitetskurverne for lipase fra H. lanuginosa DSM 3819 fremgår af fig. 1 (tributyrin) og fig. 2 (olivenolie/PVC). Kurverne for DSM 4109, DSM 4110 og DSM 4111 var

tilsvarende, idet de viste optimum ved pH 10,0 - 10,5 ved begge metoder. pH-aktivitetskurverne for lipase fra H. insolens DSM 1800 fremgår af fig. 3 (tributyryn) og fig. 4 (olivenolie/PVC):

- 5 Isoelektrisk fokusering blev udført på de fem lipaser, hvorefter et lag med tributyrin blev lagt ovenpå for at påvise lipaseaktiviteten. Det viste sig, at DSM 3819, DSM 4109, DSM 4110 og DSM 4111 alle har lipaseaktiviteter med pI omkring 4,5, mens DSM 1800 har størstedelen af dets lipase-
10 aktivitet med pI omkring 9,0 - 9,5 og kun en ubetydelig mængde lipaseaktivitet med pI omkring 4,5.

Ved en foretrukket udførelsesform tilvejebringes det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen som et ikke-støvende granulat eller som en væske. Disse er egnede til
15 anvendelse i henholdsvis pulverdetergenter og flydende detergenter. Granulater kan fremstilles på flere forskellige måder. Der kan henvises til britisk patentskrift nr. 1,362,365, som beskriver fremstillingen af enzymholdigt granulat til anvendelse som detergentadditiver ved hjælp af et apparat omfattende
20 en ekstruder og en sfæronisator (solgt som MAMUMERIZER®), og til US patentskrift nr. 4,106,991, som beskriver fremstillingen af enzymholdigt granulat til anvendelse som detergentadditiver ved hjælp af en tromlegranulator.

Hvad angår en flydende formulering har lagerstabiliteten en tendens til at være utilstrækkelig, og en væske med
25 et enzymstabiliseringsmiddel er derfor foretrukket. Stabiliseringsmidler kan være propylenglycol eller andre midler, der er kendt som stabiliseringsmidler til enzymopløsninger. Som det fremgår senere i denne beskrivelse har en ren vandig op-
30 løsning af lipasen som anvendes ifølge opfindelsen en ringe lagerstabilitet, men den kan forbedres betydeligt ved at inkludere stabiliseringsmidler, f.eks. propylenglycol.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen er lipase-
35 aktiviteten over ca. 10.000 LU/g additiv. Lipaseenhed (LU) bliver defineret senere i denne beskrivelse. På denne måde dannes en passende lipaseaktivitet i vaskeflotten, når deter-

gentadditivet tilsættes til detergentet i en mængde af 0,1 til 5,0 g/100 g detergent, og når detergentet tilsættes til vaskeflotten i en mængde af 0,5 - 20 g detergent/l vaskeflotte.

I en særligt foretrukket udførelsesform indeholder
5 det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen andre detergentenzymer udover lipasen, såsom protease, amylase eller cellulase. Alkaliske Bacillus-proteaser er foretrukket på grund af deres velkendte virkning som detergentproteaser. Som sådanne enzymer kan det proteolytiske enzym ALCALASE® fra Novo
10 Industri A/S, fremstillet mikrobielt ved dyrkning af Bacillus licheniformis, eller de proteolytiske enzymer SAVINASE® og ESPERASE®, også fra Novo Industri A/S, fremstillet i henhold til US patentskrift nr. 3,723,250, anvendes. Det blandede enzymatiske additiv kan fremstilles enten ved at blande et
15 tidligere fremstillet granulat af proteinase med et tidligere fremstillet granulat af lipase, eller ved at blande et koncentrat af proteinase med et koncentrat af lipase og derefter indføre blandingen i et granuleringsapparat, sammen med de sædvanlige granuleringshjælpemidler.
20 Nutildags er protease en almindelig detergentbestanddel, og som det vil fremgå senere, er lipaser som anvendes ifølge opfindelsen i udstrakt grad kompatible i detergentopløsninger med vigtige detergentproteaser, såsom de ovenfor angivne. Hvis både lipase og protease skal tilsættes
25 til et detergent kan det være passende at anvende dem i form af et blandet additiv.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen er den proteolytiske aktivitet mellem ca. 0,5 og ca. 3,0 Ansonenheder/g
30 additiv. På denne måde tilvejebringes en passende proteolytisk aktivitet i vaskeflotten når detergentadditivet tilsættes til detergentet i en mængde af 0,2 - 2 g/100 g detergent, og når detergentet tilsættes til vaskeflotten i en mængde af 0,5 - 20 g detergent/l vaskeflotte. Den velkendte Anson hæmoglobin-
35 metode for proteolytisk aktivitet er beskrevet i Journal of General Physiology, 22, 79-89 (1959).

I overensstemmelse med den tidligere nævnte udførelsesform for additivet ifølge opfindelsen kan detergentet ifølge opfindelsen være et pulver eller et flydende detergent, og kan om ønsket omfatte andre detergentenzymer, såsom protease, amylase eller cellulase, enten i det samme additiv eller som separate additiver.

I en særligt foretrukket udførelsesform for detergentet ifølge opfindelsen indeholder detergentet det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen i en mængde af mellem 0,1 og 5% w/w, mere fortrinsvis i en mængde af 0,2 - 2% w/w. På denne måde tilvejebringes en passende balance mellem enzymvirkningen og virkningen af andre detergentbestanddele.

Detergentet anvendes typisk i koncentrationer på 0,5 - 20 g/l vaskeflotte, og passende lipaseaktivitet i vaskeflotten er 1.000 - 10.000 LU/l, mere fortrinsvis 1.000 - 5.000 LU/l. Således er lipaseaktiviteten i detergentet i en foretrukket udførelsesform 50 - 20.000 LU/g, fortrinsvis 50 - 10.000 LU/g, mere fortrinsvis 250 - 2.000 LU/g og mest fortrinsvis 500 - 2.000 LU/g detergent.

Som ovenfor nævnt er den foretrukne lipase i additivet over 10.000 LU/g, og denne tilsættes til detergenterne i mængder af fortrinsvis 0,1 - 5% w/w og mere fortrinsvis 0,2 - 2% w/w. Følgelig er lipaseaktiviteten i detergenterne ifølge en anden foretrukket udførelsesform 10 - 500 LU/g, mere fortrinsvis 20 - 200 LU/g detergent.

I en særligt foretrukket udførelsesform omfatter detergentet ifølge opfindelsen andre detergentenzymer foruden lipasen, mest fortrinsvis en protease. Foretrukne detergentproteaser er de, der allerede er nævnt. Lipase og protease kan tilsættes til detergentet enten separat eller i form af et blandet additiv. Som allerede nævnt anvendes proteaser almindeligvis i detergenter, og lipaser som anvendes ifølge opfindelsen udviser en bemærkelsesværdig stabilitet i detergentopløsning med de kommercielt vigtige proteaser. I overensstemmelse med ovennævnte foretrukne værdier for proteaseaktivitet foretrækkes en

proteaseaktivitet i detergentet på 0,0005 - 0,15 AU/g, mere fortrinsvis 0,001 - 0,060 AU/g, endnu mere fortrinsvis 0,003 - 0,025 AU/g og mest fortrinsvis 0,006 - 0,010 AU/g detergent.

I en særligt foretrukket udførelsesform for detergentet ifølge opfindelsen omfatter det overfladeaktive materiale 30-100% anionisk og 0-70% ikke-ionisk overfladeaktivt stof, mest fortrinsvis 50-100% anionisk og 0-50% ikke-ionisk overfladeaktivt stof. Vaskevirkning af lipase som anvendes ifølge opfindelsen er særlig udtalt i detergenter med et højt indhold af anioniske midler, såsom LAS (lineær alkylbenzensulfonat).

I en særligt foretrukket udførelsesform i vaskeprocessen ifølge opfindelsen indeholder vaskeflotten detergentet ifølge opfindelsen i en mængde af mellem 0,5 og 20 g/l vaskeflotte. På denne måde tilvejebringes en passende lipaseaktivitet i vaskeflotten, nemlig typisk mellem 1.000 og 10.000 LU/l vaskeflotte, fortrinsvis mellem 1.000 og 5.000 LU/l vaskeflotte.

EKSEMPLER

20 Lipaseaktivitet

Fremgangsmåden er baseret på hydrolyse af tributyrin i en pH-stat. 1 LU (Lipase Unit - lipaseenhed) er mængden af enzym, som frigør 1 μ mol titrerbar smørsyre pr. minut ved 30°C, pH 7.0 med gummi arabicum som et emulgeringsmiddel.

Yderligere detaljer gives i Novo Analytical Method AF 95/5, som efter anmodning kan rekvireres.

EKSEMPEL 1Lipase fra *H. lanuginosa* DSM 3819

Fyrre 500 ml rystekolber hver med 200 ml PL-lc medium (sammensætning følger) blev hver podet med 0,2 ml af en 5 opslemning af sporer, fremstillet ud fra skrårør med *H. lanuginosa* DSM 3819, voksende på YPG-agar (sammensætning følger) i 5 dage ved 45°C. De således podede rystekolber blev rystet i 3 dage ved 45°C med en hastighed på 240 omdrejninger pr. minut. På dette tidspunkt var lipaseaktiviteten i den opsamlede væske 10 (6,7 liter) 104 LU/ml. Cellerne blev fjernet ved centrifugering ved en hastighed på 4000 omdrejninger pr. minut i 25 minutter. Derved fik man 5,9 liter supernatant. Supernatanten blev filtreret gennem et 10 µ nylonfilterstof og derefter koncentreret 8 gange ved ultrafiltrering på Pellicon UF Cassette system 15 (membraner med en nominel molekylvægtsgrænse på 10.000).

UF-koncentratet (endeligt volumen på 740 ml) blev omdannet til råpulver ved frysetørring. Dette råpulver udviste en lipaseaktivitet på 13.310 LU/g.

Sammensætningen af YPG-agar var som følger:

20	Gærekstrakt, Difco	4	g/l
	Glucose	15	g/l
	K ₂ HPO ₄	1	g/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	g/l
	Agar	20	g/l
25	Autoklavering ved 121°C i 40 minutter		

Sammensætningen af PL-lc medium var som følger:

	Pepton	15	g/l
	Tween-80	18	g/l
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	2	g/l
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1	g/l
5	Nalco-10	2	g/l
	pH før autoklavering	6,0	
	Autoklavering ved 121°C i 40 minutter		

EKSEMPEL 2Lipase fra andre Humicola-stammer

- 10 Stamme DSM 4111 blev gæret på medium PL-1c, stamme DSM 4109 på medium GT, stamme DSM 4110 på medium GTS-1, og Stamme DSM 1800 på medium LR-8ST, hovedsageligt som beskrevet i eksempel 1.

		Sammensætning af gæringsmedium			
		GT	GTS-1	LR-8ST	
15	Gærekstrakt (65% tørstof)	g/l	22,5	15	0
20	Pharmamedia	-	0	0	50
	Tween 80	-	18	5	5
	Span 80	-	0	5	5
25	MgSO ₄ , 7H ₂ O	-	2	2	0,5
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	-	0,1	0,1	0
30	K ₂ HPO ₄	-	0	0	5
	NaNO ₃	-	0	0	1
	Nalco-10	-	5	2	0
35	pH før autoklavering		ca. 6,5	ca. 6,0	ca. 7,0

Udvinding fra kulturvæskerne blev hovedsageligt udført som beskrevet for DSM 3819 i eksempel 1. I tilfældet med lipase fra DSM 4109 blev et ekstra oprensningstrin udført forud for frysetørring, idet UF-concentratet blev udfældet med acetone, hvorefter det udfældede blev opløst igen i vand og frysetørret. De endelige frysetørrede pulvere udviste følgende lipaseaktiviteter:

Stamme	DSM 4111	DSM 4109	DSM 4110	DSM 1800
LU/g	32.000	211.000	6.600	1.800

10 Vaskemetode

Det prøvemateriale, der blev anvendt i vaskeforsøg, var bomuldsstof (med en overfladevægt svarende til ca. 1,2 g/50 cm²) imprægneret med olivenolie (Sigma 0-1500). Lapperne blev fremstillet ved at påføre 50 eller 85 µl (som angivet)

15 olivenolie, opvarmet til 50-60°C, i midten af hver prøvelap (7 x 7 cm) ved hjælp af en mikropipette. Efter oliepåføringen blev lapperne ældet ved stuetemperatur i 2 dage.

Lipasepræparaterne fra eksempel 1 og 2 blev anvendt og identificeret ved stammenumrene.

20 Til sammenligning anvendtes endvidere i dette eksempel et lipolytisk pulver på basis af *Fusarium oxysporum*, fremkommet som beskrevet i eksempel 23 i europæisk patentansøgning med publikationsnummer 0 130 064, som repræsenterende det mest effektive kendte lipolytiske detergentadditiv. *Fusarium oxy-*
 25 *sporum* lipasepræparatets aktivitet var 90.000 LU/g.

Lipaserne blev bedømt ved vaskeforsøg i en Terg-O-Tometer forsøgsvaskemaskine. Terg-O-Tometer forsøgsvaskemaskinen er beskrevet hos Jay C. Harris, Detergency evaluation and testing, Interscience Publishers Ltd., 1954, side 60 - 61.

30 Vaskeforsøgene udførtes under følgende betingelser:

	Omrøring	100 omdrejninger pr. minut
	Vandets hårdhedsgrad	18°dH (fra hanen), hvis andet ikke er angivet
	stof/væske forhold	7 lapper/1000 ml
5	skylning	15 min under løbende hane

Mængden af olie, der var indeholdt i 7 lapper med 85 µl hver er ca. 535 mg (vægtfylde 0,90).

Efter skylning blev lapperne lufttørret. Restindholdet af olie i lapperne blev bestemt ved Soxhlet ekstraktion med n-hexan i 5 timer efterfulgt af gravimetrisk bestemmelse af restmængden.

Sammensætningen af restolien blev analyseret ved hjælp af TLC-FID (TLC-FID er en forkortelse af "thin layer chromatography/flame ionization detector", og fremgangsmåden er beskrevet i Lipids, vol. 18, nr. 10 (1983), side 732) metoden, hvor der anvendes en Iatroscan TH-10 (Iatron Lab. Inc., Tokyo) kombineret med en Chromatocorder II (System Instruments Co., Ltd., Tokyo) integrator ved følgende betingelser:

	fast fase	Chromarod S-II (Iatron)
20	mobil fase	Hexan/ethylater/eddikesyre (60:50:2 v/v/v)
	hydrogentilførsel	160 ml/min
	lufttilførsel	2000 ml/min
	scanningshastighed	30 sek. pr. scanning

25 Prøver til TLC-FID analysen blev fremstillet som følger. Efter gravimetrisk bestemmelse af restmængden blev det tørrede ekstrakt opløst igen i 20 ml hexan, og 5 ml intern standard (lithocholsyre, 12,5 mg/ml) opløst i ethanol blev tilsat. Til hver analyse brugtes 1 µl af prøven.

30 Baseret på standardkurver for triolein, diolein, monoolein og oliesyre blev restoliens relative sammensætning (% w/w) beregnet.

Antallet af uhydrolyserede glyceridbindinger i restolien blev beregnet ved følgende formel:

$$n = 10 \times M \left(\frac{3}{885} \times X_{TG} + \frac{2}{621} \times X_{DG} + \frac{1}{357} \times X_{MG} \right) \quad (\mu \text{ mol})$$

hvor X_{TG} = procent triglycerid (% w/w)

X_{DG} = procent diglycerid (% w/w)

5 X_{MG} = procent monoglycerid (% w/w)

M = restmængden af olie (mg)

885, 621 og 357 er molekylevægten for henholdsvis triolein, diolein og monolein.

EKSEMPEL 3

10 Virksomheden af vasketemperatur

Dette eksempel demonstrerer virkningen af Humicola lanuginosa lipasen (DSM 3819) i et anionisk detergent ved forskellige vasketemperaturer.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na_2CO_3 (1,0 g/l)

15 Vasketid: 20 minutter

Lipasedosering: 3000 LU/l

pH: 9,5

Besmudsning: 85 μl olivenolie

20 LAS er lineær alkylbenzensulfonat (Nansa HS80/S, Albright & Wilson), et anionisk overfladeaktivt stof.

Temp.		Uden lipase	Fusarium oxysporum	Humicola lanuginosa
	Restolie (mg)	185	187	165
30°C	n (μ mole)	590	571	360
25	Restolie (mg)	187	192	157
50°C	n (μ mol)	606	628	432

EKSEMPEL 4Virkning af vasketid

I dette eksempel vises virkningen af *Humicola lanuginosa* lipasen (DSM 3819) ved at anvende forskellige vasketider.

5 Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na₂CO₃ (1,0 g/l)
 Temperatur: 30°C
 Lipasedosering: 3000 LU/l
 pH (initial): 9,5
 Besmudsning: 85 µl olivenolie

10 Vasketid (min.)		Uden lipase	Fusarium oxysporum	Humicola lanuginosa
20	Restolie (mg)	185	187	165
	n (µ mol)	590	571	360
40	Restolie (mg)	177	167	128
	n (µ mol)	568	526	246
60	Restolie (mg)	141	147	93
	n (µ mol)	465	454	153
90	Restolie (mg)	139	135	78
	n (µ mol)	431	419	111

20 EKSEMPEL 5Virkning af vandets hårdhedsgrad ved vask

Dette eksempel viser indflydelsen af vandets hårdhedsgrad på vaskevirkningen af *Humicola lanuginosa* lipase (DSM 3819). Hårdhedsgraden (°dH = tysk hårdhed) blev indstillet ved 25 at blande vand fra hanen med destilleret vand.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na₂CO₃ (1,0 g/l)
 Temperatur: 30°C
 Vasketid: 20 minutter
 Lipasedosering: 3000 LU/l
 5 pH (initial): 9,5
 Besmudsning: 85 µl olivenolie

Hårdhedsgrad °dH		Uden lipase	Fusarium oxysporum	Humicola lanuginosa
10	0 Restolie (mg)	254	244	242
	n (µ mol)	820	752	627
6	Restolie (mg)	210	192	173
	n (µ mol)	670	595	415
12	Restolie (mg)	182	179	170
	n (µ mol)	579	548	405
15 18	Restolie (mg)	185	187	165
	n (µ mol)	590	571	360

EKSEMPEL 6

Virkning af lipasedosering ved vask

Dette eksempel viser, hvilken betydning dosering af H. lanuginosa lipase har ved vaskeudførelser under anvendelse af acetonefraktioneret lipasepulver fra DSM 3819.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na₂CO₃ (1,0 g/l)
 Vasketid: 20 minutter
 Temperatur: 30°C
 25 pH (initial): 9,5
 Besmudsning: 85 µl olivenolie

De besmudsede lapper, der anvendtes, var fra en anden portion end i eksemplerne 2 - 5, så resultaterne kan ikke sammenlignes direkte.

Lipasedosering, LU/ml	0	500	1500	3000	6000	10,000
Restolie (mg)	232	209	202	202	194	176
n (μ mol)	761	558	521	471	437	363

EKSEMPEL 7**5 Sammenligning af Humicola lipaser ved vask**

Dette eksempel sammenligner den vaskevirkning, der blev opnået med lipase fra *H. lanuginosa* (DSM 4109), *H. brevis* var. *thermoidea* (DSM 4111), *H. brevispora* (DSM 4110) og *H. insolens* (DSM 1800).

10	Detergentsammensætning: LAS	0,50 g/l
	Talgsæbe	0,05 -
	Alkoholethoxylat (C ₁₂₋₁₄ ,6EO)	0,10 -
	Alkoholethoxylat (C ₁₆₋₁₈ ,30EO)	0,02 -
	Zeolite	1,20 -
15	Na ₂ CO ₃	0,50 -
	Natriummetasilicat	0,10 -
	EDTA (titriplex III)	0,01 -
	Na ₂ SO ₄	2,00 -
	Temperatur:	30°C
20	Vasketid:	20 minutter
	Lipasedosering:	6000 LU/l
	pH:	9,5
	Besmudsning:	50 μ l olivenolie

<u>Lipasepræparat</u>	<u>n (μ mol)</u>
intet	546
H. lanuginosa	454
H. brevis var. thermoidea	468
5 H. brevispora	484
H. insolens	350

EKSEMPEL 8Stabilitet af Humicola lipase overfor protease

Den udmærkede stabilitet af Humicola lipaser i deter-
 10 gentopløsninger indeholdende proteolytiske enzymer vises i
 nedenstående.

Et Humicola lanuginosa præparat (DSM 4109) sammen-
 lignes med den Fusarium oxysporum lipase, der blev anvendt i de
 foregående eksempler og med det kommercielle lipasepræparat,
 15 Amano P (Amano Pharmaceutical co. Ltd., Nagoya, Japan), som er
 fremstillet af Pseudomonas fluorescens.

De alkaliske Bacillus proteaser ALCALASE®, SAVINASE®
 og ESPERASE® anvendtes. Disse er kommercielle detergentproteaser
 fra Novo Industri A/S, Danmark.

20 Den proteolytiske aktivitet blev bestemt med kasein
 som substratet. En Kasein proteaseenhed (CPU) blev defineret som
 mængden af enzym, der frigør 1 mM af primære aminogrupeer
 (bestemt ved sammenligning med en serinstandard) pr. minut under
 standardbetingelser, dvs inkubation i 30 minutter ved 25°C og pH
 25 9,5. En 2% (w/v) opløsning af kasein (Hammersten, solgt af Merck
 A.G., Vesttyskland) blev fremstillet med Universalpufferen, der
 er beskrevet i Britton og Robinson (Journ.Chem.Soc. 1931, s.
 1451) indstillet til pH 9,5.

- Detergent: 1,3 g/l af et fosfat-frit pulver indeholdende 25% overfladeaktivt stof (alfa-olefin sulfonate (AOS) og lineær alkylbenzensulfonat (LAS)), natriumsulfat, zeolite, natriumsilicat og optisk hvidt.
- 5
- Vandets hårdhedsgrad: 4,5°dH
- pH: 10,0 (indstillet)
- Temperatur: 25°C
- 10 Lipaseaktivitet (initial): 3000 LU/l
- Proteaseaktivitet: 0 eller 0,05 CPU/l
- Resterende lipaseaktivitet (%):

1) Protease: SAVINASE®

15	Lipase	Inkubationstid (min)				
		0	15	30	60	90
	Humicola lanuginosa	100	99	94	91	89
	Fusarium oxysporum	100	32	14	3	-
20	Pseudomonas fluorescens	100	1	0	-	-

2) Protease: Ingen

25	Lipase	Inkubationstid (min)				
		0	15	30	60	90
	Humicola lanuginosa	100	101	99	102	96
	Fusarium oxysporum	100	57	42	18	6
	Pseudomonas fluorescens	100	94	94	88	90

5	Detergent:	LAS	0,40 g/l
		Alkoholethoxylat (Berol 065)	0,15 g/l
		Talgsæbe	0,15 g/l
		Natriumtripolyfosfat	1,50 g/l
		Natriummetasilicat	0,40 g/l
		CMC	0,05 g/l
		Na ₂ SO ₄	2,10 g/l

Vandets hårdhedsgrad: 18°dH

pH: 9,5

10 Temperatur: 30°C

Lipaseaktivitet: 3000 LU/l

Proteaseaktivitet: 0 eller 0,05 CPU/l

1) Protease: SAVINASE®

15	Lipase	Inkubationstid (min)				
		0	15	30	60	90
	Humicola lanuginosa	100	99	98	97	97
	Fusarium oxysporum	100	5	0	-	-
	Pseudomonas					
20	fluorescens	100	0	-	-	-

2) Protease: ALCALASE®

25	Lipase	Inkubationstid (min)				
		0	15	30	60	90
	Humicola lanuginosa	100	98	97	95	95
	Fusarium oxysporum	100	24	4	0	-
	Pseudomonas					
	fluorescens	100	18	0	-	-

3) Protease: ESPERASE®

Lipase	Inkubationstid (min)				
	0	15	30	60	90
5 Humicola lanuginosa	100	97	96	96	98
Fusarium oxysporum	100	20	0	-	-
Pseudomonas fluorescens	100	0	-	-	-

4) Protease: Ingen

Lipase	Inkubationstid (min)				
	0	15	30	60	90
10 Humicola lanuginosa	100	96	95	96	94
Fusarium oxysporum	100	30	10	0	-
15 Pseudomonas fluorescens	100	101	102	102	99

Det ses, at Humicola lipasen ifølge opfindelsen er meget stabil i detergentopløsninger med protease i modsætningen til kendte detergentlipaser (Fusarium og Pseudomonas).

20 EKSEMPEL 9

Stabiliseret flydende Humicola lipasepræparat

Lipasestabilitet i opløsninger med forskellige stabiliseringsmidler blev undersøgt.

Lipase: Humicola lanuginosa (DSM 4109)
 25 Lagringstemp: 30°C
 pH: 7,0

Rodalon® blev tilsat til alle præparaterne som konserveringsmiddel (0,2 mg aktivt stof pr. ml).

Resultater:

	1,2-propandiol (ml/ml)	Sorbitol (g/ml)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (mg/ml)	INITIAL AKTIVITET (LU/ml)	Restaktivitet (%), dage				
					0	2	13	29	49
5									
1	0	0	0	4520	100	17	2	1	1
2	0,50	0	0	4520	100	93	63	35	34
10									
3	0,50	0	3	4720	100	86	76	54	48
4	0	0.30	0	4880	100	57	10	1	1

Disse resultater viser, at 1.2-propandiol (MPG = mono-propylenglycol) er et udmærket stabiliseringsmiddel for Humicola
lipase. Lagerstabiliteten blev yderligere forbedret ved tilsæt-
ning af Ca salt. Sorbitol har en svagt stabiliserende virkning.

Et vaskeforsøg blev udført med stabiliseret flydende lipasepræparat med følgende sammensætning:

	Humicola lanuginosa DSM 4109 lipase	5000 LU/ml
20	1.2-propandiol	50% v/v
	Deioniseret vand	50% v/v
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3 mg/ml

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na₂CO₃ (1,0 g/l)

Temperatur: 30°C

25 Vasketid: 20 minutter

pH: 9,5

Besmudsning: 50 µl olivenolie

Lipasedosering: 1 ml stabiliseret flydende præparat pr.
liter vaskeflotte.

Resultater:

Lipasedosering		Restolie (mg)	n (μ mol)
LU/l			
	0	157	507
5	5000	145	418

EKSEMPEL 10

Humicola lipase som støvfrit granulat

En granulatbærer uden enzym blev hovedsageligt fremstillet i henhold til US patentskrift nr. 4,106,991 med følgende sammensætning:

	15%	cellulosefibre
	4%	titaniumdioxid
	5%	gult dextrin
	10%	saccharose
15	64%	natriumsulfat

Dette granulat blev sigtet for at opnå en partikelstørrelse på 300-710 μ m.

30,8 g af dette blev befugtet med 6,2 g af en 30% opløsning i ethanol af polyvinylpyrrolidon (PVP K30, produkt af GAF Corp., USA). Efter grundig blanding blev 12,3 frysetørret H. lanuginosa DSM 4109 lipase (92.700 LU/g, hovedsageligt fremstillet som i eksempel 2) tilsat, og blev grundigt blandet. Granulatet blev tørret (fordampning af ethanol) ved gennemblæsning (fluidisering) ved ca. 50°C. Partikler med partikelstørrelser på 300-850 μ m blev opsamlet ved sigtning.

Granulatet blev derefter overtrukket i tre trin som følger:

- 5% polyethylenglycol (MW 600)
- 11,25% TiO_2/Mg silicat (4:1)
- 4% polyethylenglycol (MW 600)

Det overtrukkede granulat blev gennemblæst ved 0,8 5 m/sekund i 10 minutter for at fjerne fine partikler af overtræksmateriale. Endelig blev materialet igen sigtet, og partikler med partikelstørrelser fra 300 til 850 μm blev opsamlet. Et støvfrit, offwhite granulat blev opnået.

Udbytte og aktivitet blev som følger:

10	frysetørret pulver	92.700 LU/g	12,3 g
	uovertrukket granulat	21.100 -	45,0 -
	overtrukket granulat	18.200 -	

Et vaskeforsøg blev udført med det frysetørrede pulver og granulatet som følger:

15	Detergentsammensætning:	LAS (0,5 g/l), Na_2CO_3 (1,0 g/l)
	Temperatur:	30°C
	Vasketid:	20 minutter
	Lipasedosering:	6000 LU/l
	pH:	10,0
20	Besmudsning:	50 μl olivenolie

Resultater:

Lipasepræparat	n (μmol)
intet	515
frysetørret pulver	386
25 granulat	415

PATENTKRAV

1. Enzymatisk detergentadditiv, hvori den aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, **kendetegnet** ved, at lipasen kan fremstilles ved hjælp af en stamme af slægten *Humicola*, inklusive slægten *Thermomyces*.
2. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at stammen tilhører *H. lanuginosa*, *H. brevispora*, *H. brevis* var. *thermoidea* eller *H. insolens*.
3. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 2, **kendetegnet** ved, at stammen er *Humicola lanuginosa* DSM 3819 eller 4109, *Humicola brevispora* DSM 4110, *Humicola brevis* var. *thermoidea* DSM 4111 eller *Humicola insolens* DSM 1800.
4. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 - 3, **kendetegnet** ved, at additivet er tilvejebragt som et ikke-støvende granulat eller en væske.
5. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 - 4, **kendetegnet** ved, at additivet udover lipasen indeholder et proteolytisk enzym.
6. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 5, **kendetegnet** ved, at det proteolytiske enzym er en alkalisk *Bacillus* protease.

7. Detergent indeholdende et enzymatisk additiv, hvis aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, **kendetegnet** ved, at det enzymatiske detergentadditiv er det enzymatiske additiv ifølge krav 1 - 6.

5 8. Detergent ifølge krav 7, **kendetegnet** ved, at det yderligere indeholder overfladeaktivt stof omfattende fra 30 til 100 vægt-% anionisk overfladeaktivt stof og fra 0 til 70 vægt-% ikke-ionisk overfladeaktivt stof.

9. Detergent ifølge krav 7 og 8, **kendetegnet** ved, at
10 detergentet yderligere indeholder en protease.

10. Fremgangsmåde til vask af tekstiler, **kendetegnet** ved, at den foretages ved en pH-værdi, der ligger mellem 7 og 12, og at der som detergent anvendes detergentet ifølge krav 7 til 9.

Fig.1

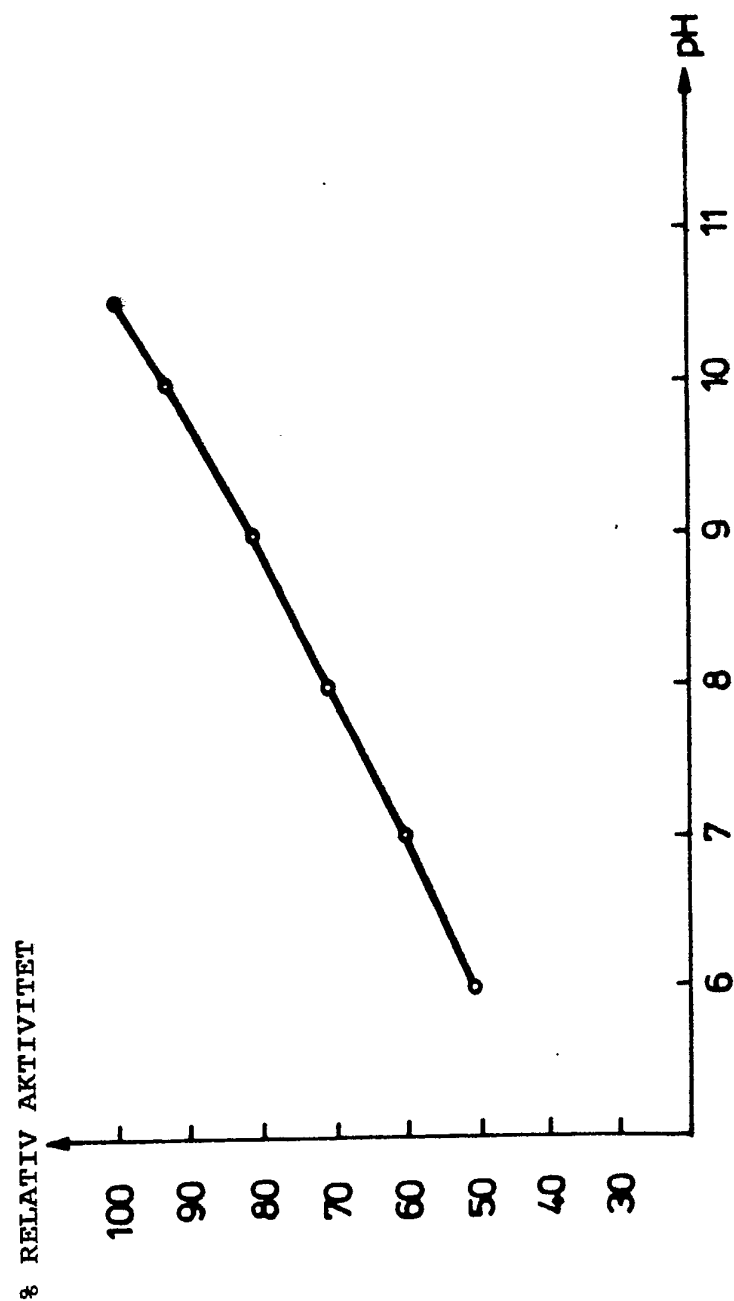


Fig. 2

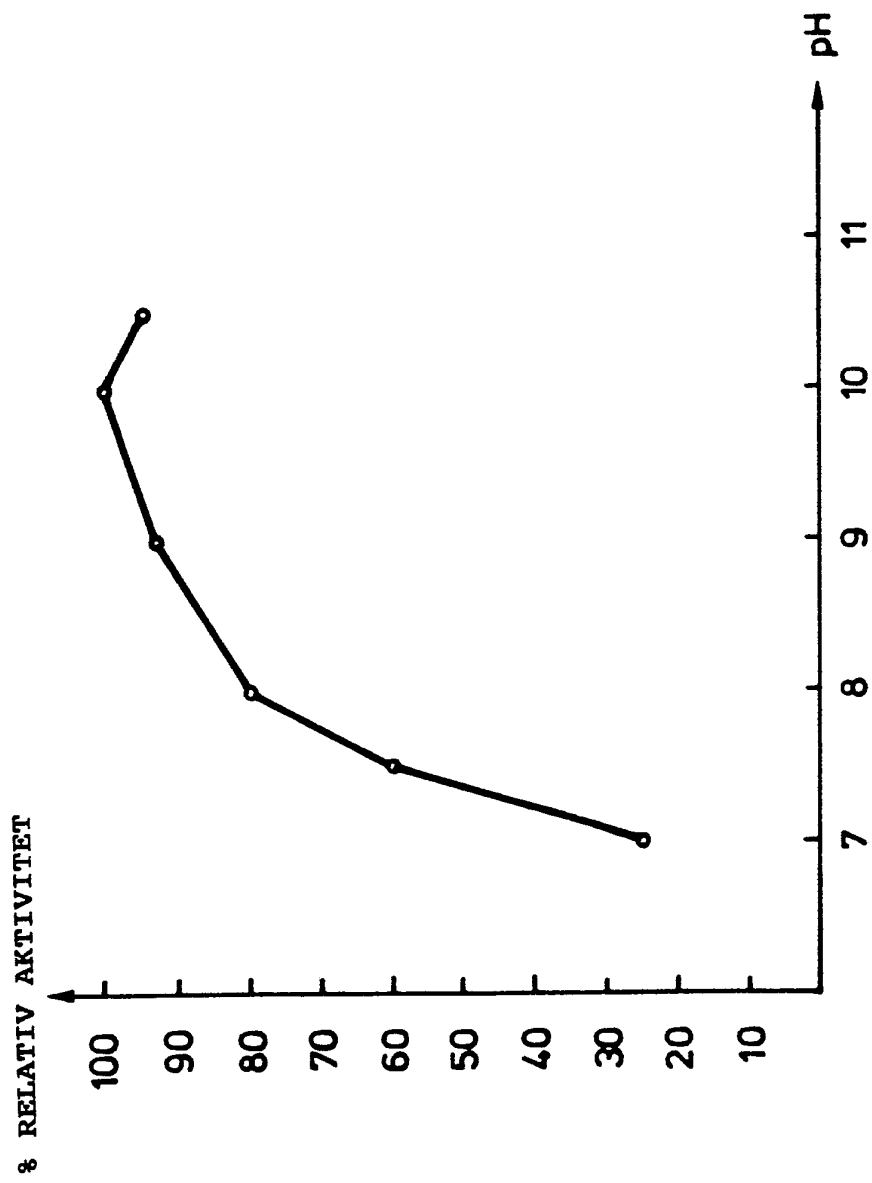


Fig. 3

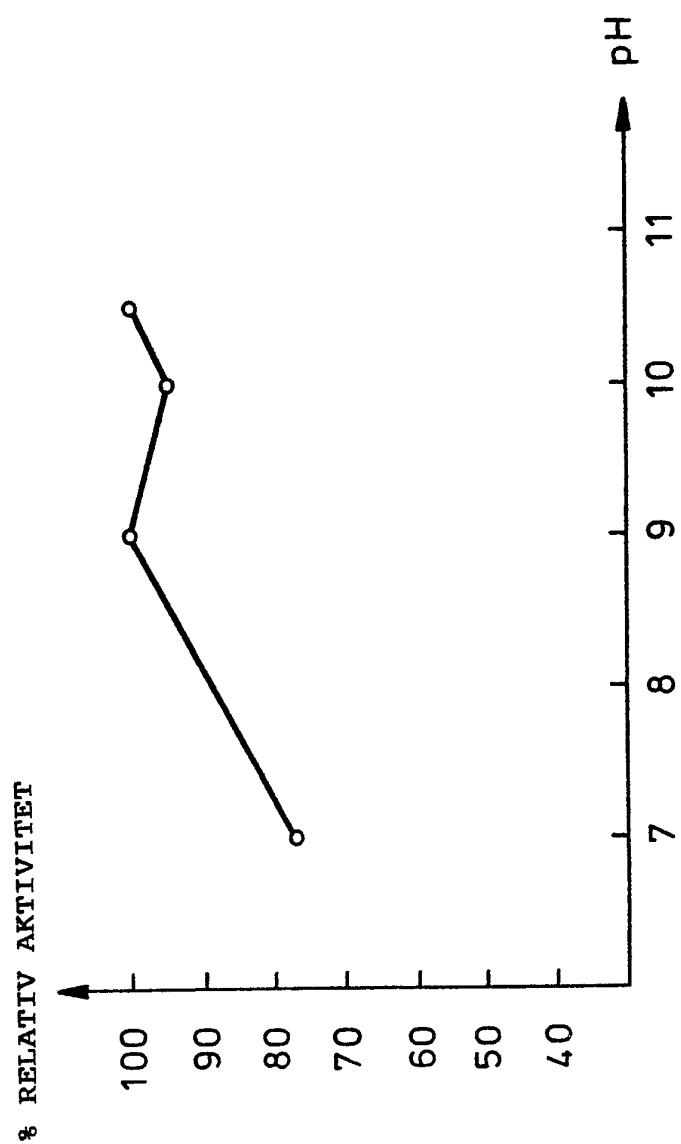


Fig. 4

