

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 163068 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2275/90	(51) Int.Cl.5	C 12 N 9/42
(22) Indleveringsdag: 21 sep 1990		C 11 D 7/42
(24) Løbedag: 22 mar 1989		
(41) Alm. tilgængelig: 23 nov 1990		
(44) Fremlagt: 13 jan 1992		
(86) International ansøgning nr.: PCT/DK89/00069		
(86) International indleveringsdag: 22 mar 1989		
(85) Videreførelsesdag: 21 sep 1990		
(30) Prioritet: 24 mar 1988 DK 1634/88 24 mar 1988 DK 1635/88		
(71) Ansøger: *Novo Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK		
(72) Opfinder: Martin *Schuelein; DK, Kirsten Bægh *Levring; DK		

(74) Fuldmægtig: -

(54) Cellulasepræparat, detergentadditiv og detergentkomposition indeholdende cellulasepræparatet samt fremgangsmåde til behandling af bomuldsholdige tekstiler med cellulasepræparatet

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag

2275-90

Et cellulasepræparat, der kan anvendes til at nedsætte ruheden i bomuldsholdige tekstiler og til nedsættelse af den hastighed, hvormed sådanne tekstiler bliver ru, indeholder mindst 40% eller mere (på basis af det totale proteinindhold) af en endoglucanasekomponent med en høj endoaseaktivitet og affinitet over for cellulase.

Den foreliggende opfindelse angår et cellulasepræparat, som er nyttigt til reduktion af ruheden i bomulds-
holdige tekstiler og til nedsættelse af hastigheden, hvormed
sådanne tekstiler bliver ru. Opfindelsen angår endvidere et
5 detergentadditiv, som omfatter cellulasepræparatet, en deter-
gentkomposition indeholdende cellulasepræparatet, så vel som
en fremgangsmåde til behandling af bomuldsholdige tekstiler
med cellulasepræparatet.

Det er velkendt, at gentagen vask af bomuldsholdige
10 tekstiler almindeligvis forårsager en udtalt, ubehagelig
ruhed i stoffet, og der er tidligere i den kendte teknik
foreslået adskillige metoder til løsning af dette problem.
For eksempel beskriver GB 1.368.599 (Unilever Ltd.)
anvendelsen af cellulytiske enzymer til reduktion af ruheden
15 i bomuldsholdige tekstiler. Desuden beskriver US patentskrift
nr. 4.435.307 (Novo Industri A/S) anvendelsen af et cellul-
tisk enzym hidrørende fra Humicola insolens så vel som en
fraktion deraf med betegnelsen AC_xI, som ruhedsreducerende
detergentadditiv. Andre anvendelsesområder for beskrevne
20 cellulytiske enzymer er farveklaring og fjernelse af snavs i
stof (se f.eks. EP 220 016).

Skønt anvendelsen af cellulytiske enzymer til ru-
hedsreduktion i bomuldsholdige tekstiler blev foreslået og
påvist for næsten 20 år siden, er mekanismerne i denne proces
25 endnu ikke forklaret eller kendt i detaljer. Dette skyldes
blandt andet mangfoldigheden af enzymer og de involverede
enzym-katalyserede reaktioner. Faktisk er de naturligt frem-
bragte cellulaser, f.eks. af mikrobielle arter, komplekse
blandinger af cellulytiske enzymer. Som en følge deraf er den
30 af cellulaser katalyserede forandring af naturligt fore-
kommende materialer som bomuld uhyre vanskelig at analysere
detaljeret.

Grundet disse omstændigheder er den praktiske ud-
nyttelse af enzymatisk ruhedsreduktion og -forebyggelse, hvor
35 ønskværdig den end måtte være, ikke blevet almindeligt ud-
bredt eller af større praktisk betydning: det er vanskeligt
at optimere produktionen af sammensatte enzymsystemer og
dermed iværksætte industriel rentabel produktion af cellu-

lytiske enzymer, og deres anvendelse i praksis er blevet vanskeliggjort af nødvendigheden af, at der skal anvendes temmelig store mængder af de cellulolytiske enzymer for at opnå den ønskede reduktion og forebyggelse af ruhed i bomulds-
5 tekstiler: for eksempel er hverken tilsætning af store mængder af enzymer til detergentkomposition forenelig med andre bestanddeles optimale funktion, eller tilsætning af meget store enzymmængder til detergentkompositionen i forbrugernes interesse.

10 Det har nu overraskende vist sig, at enzymatisk blødgøring af celluloseholdige tekstiler, især bomuldsholdige tekstiler, såvel som fjernelse af snavs og farveklaring kan tilvejebringes af en cellulasefraktion med øget endoglucanaseaktivitet.

15 Den foreliggende opfindelse angår derfor et cellulasepræparat, som er ejendommeligt ved, at det omfatter mindst 50% (vægt% af det totale cellulaseindhold) af en i det væsentlige homogen endoglucanasekomponent med følgende egenskaber:

20 (a) en CMC-endoaseaktivitet [defineret som endoglucanaseaktiviteten af endoglucanasekomponenten udtrykt ved evnen til at nedsætte viskositeten i en carboxymethylcellulose (CMC) opløsning, som bestemt ved fremstilling af en substratopløsning på 35 g/l CMC i 0,1 M tris puffer ved pH 9,0,
25 opløsning af en prøve af cellulasepræparatet i den samme puffer, blanding af 10 ml af substratopløsningen og 0,5 ml af enzymopløsningen og overføring af blandingen til et viskosimeter thermostatteret ved 40°C, hvor 1 enhed CMC-endoaseaktivitet er defineret som den mængde enzym, der nedsætter viskositeten af CMC opløsningen til halvdelen efter 30 minutter]
30 på mindst 5 CMC-endoaseenheder pr. mg totalt protein,

(b) en CAVU aktivitet [defineret som affiniteten af endoglucanasekomponenten for cellulose, som bestemt ved tilsætning af ca. 50 CMC-endoaseenheder i 10 ml tris puffer, pH 9,0, til
35 2,5 g Avicel®, omrøring af suspensionen i 30 minutter ved

stuetemperatur, centrifugering i 10 minutter ved 3000 rpm og måling af CMC-endoaseaktiviteten i supernatanten, hvor % CAVU aktivitet beregnes som forskellen mellem total CMC-endoaseaktivitet af henholdsvis den originale opløsning og supernatanten divideret med den totale CMC-endoaseaktivitet og ganget med 100] på mindst 50% under basiske betingelser, og

(c) et pH-optimum ved pH ca. 7,5-10,

og at cellulasepræparatet i det væsentlige ikke udviser nogen cellobiohydrolaseaktivitet (hvor cellobiohydrolaseaktivitet er defineret som aktiviteten over for cellobiose p-nitrophenyl, bestemt som beskrevet nedenfor).

Det bemærkes, at endoglucanasekomponenten i cellulasepræparatet ifølge den foreliggende opfindelse er aktiv (udtrykt i CMC-endoase og CAVU aktivitet) under basiske betingelser, idet den som anført ovenfor har et pH optimum ved en pH på ca. 7,5 - 10. I modsætning til adskillige kendte cellulaser, som er aktive ved surt pH og relativt inaktive ved basiske pH-værdier, gør denne egenskab hos cellulasepræparatet ifølge den foreliggende opfindelse præparatet særlig anvendeligt til vaskeformål, især som en bestanddel i en detergentkomposition, eftersom tøjvask typisk finder sted under basiske betingelser på grund af de fleste vaskedetergents basiske egenskaber. Alkalophile cellulaser er kendt, f.eks. fra EP 271 004; men cellulasepræparater indeholdende en endoglucanasekomponent, som udviser høj affinitet over for cellulose under basiske betingelser, er hidtil ukendte.

Den iagttagelse, at en bestemt endoglucanasekomponent i cellulase er ansvarlig for blødgøringen af bomuldsholdige tekstiler, er af stor praktisk betydning: den tillader en rentabel produktion af tekstilblødgørende cellulytiske enzymer, f.eks. ved anvendelse af rekombinant DNA-teknikker til fremstilling af den aktive komponent, den gør den effektive anvendelse af disse enzymer praktisk mulig, og den tillader en identifikation af cellulytiske enzymer med en

høj affinitet over for cellulose til anvendelse som blødgørere af tekstil.

Foretrukne cellulasepræparater ifølge opfindelsen er sådanne, i hvilke endoglucanasekomponenten udviser en CMC-endoase-aktivitet på mere end ca. 10, især mere end ca. 15 CMC-endoase-enheder pr. mg. totalt protein. Endoglucanasekomponenten udviser især en CMC-endoase-aktivitet på ca. 50 eller flere CMC-endoase-enheder pr. mg totalt protein. Andre foretrukne cellulasepræparater er sådanne, i hvilke endoglucanasekomponenterne udviser en CAVU aktivitet på mere end ca. 65%, især mere end ca. 75%. Særligt foretrukne cellulasepræparater er sådanne, i hvilke endoglucanasekomponenten udviser en høj CMC-endoase-aktivitet sammenfaldende med en høj CAVU aktivitet.

I overensstemmelse med principperne for den foreliggende opfindelse er det en fordel, at cellulasepræparatet er så rent som muligt, d.v.s. at indholdet af endoglucanasekomponenten er så højt som muligt, således at en mindre præparatmængde er nødvendig til blødgøring af bomuldsholdige tekstiler, end hvad der er tilfældet med kendte cellulaser. Særligt foretrukne cellulasepræparater ifølge opfindelsen er sådanne, som omfatter ca. 90% (vægt% af det totale cellulaseindhold) eller mere af den egnede endoglucanasekomponent.

Cellulasepræparater ifølge opfindelsen kan fås fra planter og mikroorganismer, hvor endoglucanaser kan være til stede i små mængder sammen med et udvalg af andre cellulolytiske enzymer. Eksempler på bakterier og svampe, hvorfra eventuelt interessante cellulolytiske enzymer kan isoleres, er angivet i GB 2094826, p. 3, l. 35, til p. 6, l. 7. For at opnå cellulasepræparater ifølge opfindelsen må ubehandlede cellulaser underkastes omfattende oprensningsprocedurer ifølge kendte principper. Til industriel fremstilling af cellulasepræparater ifølge opfindelsen foretrækkes det at anvende rekombinante DNA-teknikker eller andre teknikker, som indebærer justering af fermenteringer, mutation af de anvendte mikroorganismer for at sikre overproduktion af de ønskede enzymatiske aktiviteter eller udvikling af fremgangsmåder til oprensning af endoglucanasekomponenten i stor målestok.

Sådanne metoder og teknikker er kendte og kan nemt udføres af fagfolk. I de følgende eksempler gives nogle specifikke eksempler på oprensningsteknikker, som kan anvendes til at tilvejebringe enzymer, der skal anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Det fremgår af eksemplerne, at ionbytningskromatografi, størrelsesudelukkelseskromatografi og fraktioneret udfældning er teknikker, som kan anvendes med stor fordel.

Endoglucanasekomponenten i cellulasepræparatet ifølge opfindelsen kan være en, som er fremstillet af en svamp. Man har fundet, at cellulasepræparater med en høj CMC-endoase og CAVU aktivitet nemt kan isoleres fra arten *Humicola* såsom *Humicola insolens*, især stamme DSM 1800, deponeret 1 oktober 1981 hos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig, FRG, i overensstemmelse med Budapesttraktaten om international anerkendelse af deponering af mikroorganismer i forbindelse med behandling af patentsager (Budapesttraktaten).

Som følge deraf angår den foreliggende opfindelse endvidere et cellulasepræparat indeholdende en cellulase, der kan fremstilles ved dyrkning af en stamme af *H. insolens*, hvilken cellulase omfatter mere end ca. 40%, fortrinsvis over 90% (på basis af totalt protein, bestemt ud fra OD ved 280 nm) af en endoglucanasekomponent med følgende egenskaber:

- 25 a) omtrentlig molekylvægt på ca. 65 kD (bestemt ved SDS-PAGE)
- b) isoelektrisk punkt på ca. 8,5 - 9,5
- c) endoglucanaseaktivitet på over ca. 50 CMC-endoase-enheder/mg totalt protein
- 30 d) immunologisk reaktion med polyspecifikt antistof mod en cellulase hidrørende fra *Humicola insolens* DSM 1800

En anden foretrukket mikroorganisme, hvorfra enzymer, som kan anvendes ifølge opfindelsen, kan isoleres, er stammer af *Fusarium*, hvor *Fusarium oxysporum* er foretrukket, især DSM stamme 2672, deponeret 6 juni 1983 hos

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen i overensstemmelse med Budapesttraktatens bestemmelser.

En yderligere foretrukket mikroorganisme, fra hvilken de nævnte enzymer kan isoleres, er en stamme af Myceliopthora, hvor Myceliopthora thermophile er særligt foretrukket.

Også foretrukket som kilder til enzymer, der kan anvendes ifølge opfindelsen, er arter af Erwinia, arter af Microbispora, arter af Neocallimastix, arter af Piromonas eller arter af Robillarda.

Endoglucanasekomponenten kan også være fremstillet af en bakterie, f.eks. en art af Streptomyces eller Clostridium.

Endoglucanasekomponenten kan endvidere fremstilles ifølge en fremgangsmåde, som omfatter dyrkning af en værts-celle transformeret med en rekombinant DNA vektor, som bærer en DNA sekvens, der koder for endoglucanasekomponenten så vel som DNA sekvenser, der koder for funktioner, der tillader udtrykkelse af DNA sekvensen, der koder for endoglucanasekomponenten, i et dyrkningsmedium under betingelser, der tillader udtrykkelse af endoglucanasekomponenten, og isolering af endoglucanasekomponenten fra kulturen.

Et DNA fragment, der koder for endoglucanasekomponenten, kan f.eks. isoleres ved at etablere et cDNA eller genombibliotek af en cellulaseproducerende mikroorganisme, såsom en af de nævnte organismer, og screene for positive kloner ved hjælp af kendte metoder, såsom hybridisering til oligonucleotidprober syntetiseret på basis af hele eller dele af aminosyresekvensen fra endoglucanasen eller selektion for kloner, der udtrykker den relevante enzymaktivitet (d.v.s. CMC-endoase og CAVU aktivitet som defineret ovenfor), eller selektion for kloner, der producerer et protein, som kan reagere med et antistof mod en nativ cellulase (endoglucanase) komponent.

Når DNA sekvensen er selekteret, kan den indsættes i en egnet replicerbar ekspressionsvektor omfattende egnede promoter-, operator- og terminatorsekvenser, der lader endoglucanasen blive udtrykt i en bestemt værtsorganisme, så vel

som et replikationsorigin, som tillader vektoren at replikere i den pågældende værtsorganisme.

Den resulterende ekspressionssvektor kan derpå transformeres i en egnet værtscelle, såsom en svampecelle, 5 hvor et foretrukket eksempel er en art af *Aspergillus*, mest foretrukket *Aspergillus oryzae* eller *Aspergillus niger*. Svampeceller kan transformeres ved en proces, der omfatter protoplastdannelse og transformation af protoplasterne efterfulgt af regenerering af cellevæggen på i og for sig kendt 10 måde. Anvendelsen af *Aspergillus* som værtsorganisme er beskrevet i EP 238,023 (Novo Industri A/S), hvortil der henvises.

Som et alternativ kan værtsorganismerne være en bakterie, især stammer af *Streptomyces* og *Bacillus* og *E. coli*. 15 Transformation af bakterieceller kan udføres ifølge konventionelle metoder, f.eks. som beskrevet i T. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1982.

Screeningen af passende DNA sekvenser og konstruktionen af vektorer kan også udføres efter standardfremgangsmåder, cf. T. Maniatis et al., op.cit.

Mediet, der anvendes til dyrkning af de transformerede værtsceller, kan være et hvilket som helst konventionelt medium egnet til dyrkning af de pågældende værtsceller. 25 Den udtrykte endoglucanase kan bekvemt secerneret i dyrkningsmediet og isoleres derfra ved hjælp af velkendte procedurer, herunder separering af cellerne fra mediet ved centrifugering eller filtrering, udfældning af proteinholdige dele af mediet ved hjælp af et salt såsom ammoniumsulfat, 30 efterfulgt af kromatografiske procedurer såsom ionbytterkromatografi, affinitetskromatografi eller lignende.

Ved at anvende rekombinante DNA teknikker som ovenfor beskrevet, proteinoprensningsteknikker, fermenteringsteknikker og mutations- eller andre teknikker, som er velkendte, 35 er det muligt at få endoglucanaser af høj renhed.

Cellulasepræparatet ifølge opfindelsen kan bekvemt tilsættes til bomuldsholdige tekstiler sammen med andre detergentmaterialer ved iblødsætning, vask eller skylning.

Derfor angår den foreliggende opfindelse i et andet aspekt et detergentadditiv, der indeholder cellulasepræparatet ifølge opfindelsen i form af et støvfrit granulat, stabiliseret væske eller beskyttet enzym. Støvfri granulater kan frem-
5 stilles, f.eks. ifølge US 4.106.991 og 4.661.452 (begge Novo Industri A/S) og kan eventuelt være overtrukket ifølge kendte fremgangsmåder. Flydende enzympræparater kan f.eks. stabiliseres ved tilsætning af en polyol såsom propylenglycol, en sukkerart eller sukkeralkohol, mælkesyre eller borsyre ifølge
10 kendte metoder. Andre enzymstabilisatorer er kendt. Beskyttede enzymer kan være fremstillet ifølge den i EP 238.216 beskrevne fremgangsmåde.

Detergentadditivet kan passende udvise en CMC-endoaseaktivitet (som defineret ovenfor) på 500-10.000 CMC-
15 endoaseenheder pr. gram additiv. Det er klart, at detergentadditivet yderligere kan omfatte et eller flere enzymer, såsom protease, lipase og/eller amylase, der konventionelt inkorporeres i detergentadditiver.

Ifølge et yderligere aspekt angår opfindelsen en
20 detergentkomposition, der indeholder et cellulasepræparat ifølge opfindelsen.

Detergentkompositioner ifølge opfindelsen omfatter endvidere overfladeaktive stoffer, som kan være af den anioniske, non-ioniske, kationiske, amfotere eller zwitterioniske
25 type så vel som blandinger af disse overfladeaktive klasser. Typiske eksempler på anioniske overfladeaktive stoffer er lineære alkyl benzensulfonater (LAS), alfaolefinsulfonater (AOS), alcoholethoxysulfater (AES) og alkalimetalsalte af naturlige fedtsyrer.

30 Detergentkompositioner ifølge opfindelsen kan indeholde andre kendte detergentbestanddele, f.eks. buildere, blegemidler, blegeaktivatorer, antikorrosionsmidler, sekvestreringsmidler, antismudsaflejningsmidler, parfumer, enzymstabilisatorer etc.

35 Detergentkompositionen ifølge opfindelsen kan formuleres på en hvilken som helst egnet måde, f.eks. som et pulver eller flydende middel. Enzymet kan stabiliseres i et flydende detergent ved medtagning af enzymstabilisatorer som

beskrevet ovenfor. Almindeligvis vil pH i en opløsning af detergentkompositionen ifølge opfindelsen være 7 - 12 og i nogle tilfælde 7,0 - 10,5. Andre detergentenzymer såsom proteaser, lipaser og/eller amylaser kan inkorporeres i 5 detergentkompositionerne ifølge opfindelsen, enten separat eller i et kombineret additiv som beskrevet ovenfor.

De blødgørings-, smudsfjernelses- og farveklarings-effekter, der kan opnås ved hjælp af cellulasepræparatet ifølge opfindelsen, kræver almindeligvis en koncentration af 10 cellulasepræparatet i vaskeopløsningen svarende til en endo-glucanaseaktivitet på 5 - 200 CMC-endoaseenheder pr. liter. Detergentkompositionen ifølge opfindelsen anvendes typisk i koncentrationer på 0,5 - 20 g/l i vaskeopløsningen. Som følge deraf er cellulasekoncentrationen i detergentkomposi- 15 tionen ifølge opfindelsen ca. 0,3 - 400 CMC-endoaseenheder pr. gram. Almindeligvis er det mest hensigtsmæssigt at tilsætte detergentadditivet i mængder på 0,1 - 5% w/w eller fortrinsvis i mængder på 0,2 - 2% af detergentkompositionen.

I yderligere et aspekt angår den foreliggende op- 20 findelse en fremgangsmåde til nedbringelse af hastigheden, hvormed bomuldsholdige tekstiler bliver ru eller til reduktion af ruheden i bomuldsholdige tekstiler, idet fremgangsmåden omfatter behandling af bomuldsholdige tekstiler med et cellulasepræparat ifølge opfindelsen. Fremgangsmåden ifølge 25 opfindelsen kan udøves ved behandling af bomuldsholdige tekstiler under vask. Imidlertid kan behandlingen af tekstilerne om ønsket også udføres under iblødsætning eller skylning eller simpelthen ved tilsætning af cellulasepræparatet til vandet, som tekstilerne er eller vil blive 30 anbragt i.

Den foreliggende opfindelse er beskrevet mere detaljeret i de følgende eksempler.

Eksempel 1

Anvendelse af cellulaser fra *Humicola insolens* til oprensings- og vaskeforsøg

Fraktionering af *H. insolens* cellulase

5 Cellulase fremstilles ved dyrkning af *Humicola insolens* DSM 1800 ifølge US 4.435.307, eksempel 6. Rå cellulase fjernes fra dyrkningsmediet ved filtrering på diatoméjord, ultrafiltrering og frysetørring af retentatet, jfr. eksemplerne 1 og 6 fra US 4.435.307.

10 Den rå cellulase oprenses på DEAE-Sephadex og separeres ved anionbytningskromatografi på DEAE-Sephadex ved pH 10. Den ikke-absorberede fraktion (betegnet F1) har en blødgørende virkning (pr mg protein), som er ca. dobbelt så stor som hos rå cellulase eller hos AC_xI fraktionen ifølge US 15 4.435.307).

Efter koncentration fraktioneres F1 ved en to-trins udfældning (NH₄)₂SO₄: det udfældede materiale kasseres ved 25% mætning, hvorefter det udfældede materiale opsamles ved 55% mætning og betegnes F1P1. Det har ca. tre gange så høj blødgøringseffekt som rå cellulase.

F1P1 separeres derpå ved størrelseskromatografi (Sephacryl). Proteinet eluerer i fortrinsvis tre toppe, C1, C2, og C3. C1 eluerer med en tydelig MW på ca. 80.000. C2 med en MW på ca. 65.000 og C3 med en MW på ca. 40.000. Hoved-25 aktiviteten i C1 er aktivitet over for PNP-Cellobiose. Hovedaktiviteten i C2 er endoglucanaseaktiviteten. C3-fraktionen indeholder hovedsageligt exoglucanaseaktivitet. Således er det kun F1P1C2 af de tre fraktioner, der ligger inden for opfindelsens område. Det har ca. 5 gange så stor blødgørings-30 effekt som rå cellulase.

F1P1C2 indeholder ca 50% af et enkelt protein, betegnet Endoglucanase I. Det kan yderligere oprenses ved hjælp af præparativ størrelseskromatografi, d.v.s. på en TSK søjle.

35 I det følgende sammenlignes rå cellulase og de forskellige fraktioner med hensyn til blødgøringseffekt (i

vaskeforsøg udført som beskrevet i det følgende), endoglucanaseaktivitet (CMC-endoase, som defineret ovenfor) og indeholdet af endoglucanase I (i % totalt protein, bestemt ifølge en senere angivet fremgangsmåde). Hver af disse ud-
 5 trykkes i forhold til den totale proteinmængde, bestemt ved OD ved 280 nm. Tallene angiver typiske resultater. Det menes, at nogle af de målte aktiviteter påvirkes negativt af proteaseenheder.

				Blødgøringseffekt
10	Cellulase	CMC-	% Endo I	i forhold til
	præparat	endoase	protein	proteinmængde
	<u>Kendt teknik:</u>			
	rå cellulase			1x
	AC _x I	4,5	under 10	1x
15	(US 4.435.307)			

<u>Fraktioner:</u>				
	F1	6	15	2x
	F1P1	12	25	3x
	F1P1C2	19	50	5x
20	(opfindelsen)			

Som vist fører fraktionering af rå cellulase til F1, F1P1 og til sidst F1P1C2 til en progressivt stigende blødgøringseffekt (pr proteinmængde). Fjernelsen af snavs stiger tilsvarende. De forbedrede præparater ifølge opfindelsen kan
 25 skelnes fra kendte præparater ved den øgede endoglucanaseaktivitet (CMC-endoase/mg totalt protein) og ved det forøgede indhold af Endoglucanase I. Den rå cellulase udviste en CAVU aktivitet på 78%. Fraktionernes CAVU aktiviteter lå i området 75-92%.

30 Enzymkemisk karakterisering af "Endoglucanase I"

SDS-PAGE og isoelektrisk fokusering (IEF) med markørproteiner er velegnede fremgangsmåder til bestemmelse af henholdsvis molekylvægt (MW) og isoelektrisk punkt (pI).

Ifølge disse metoder har Endoglucanase I en MW på ca. 65 kD og et pI på ca. 8,5-9,5. Den ovenfor beskrevne F1P1C2 fraktion indeholder ca. 50% af denne cellulase, og den indeholder en mindre mængde protein med en MW på ca. 50 kD og et pI på ca. 5,8. På grund af den høje grad af glycosylering kan MW i SDS gelen og pI variere på grund af forskellen i fermenteringsbetingelser og puffertype under oprensning.

Enzymaktiviteten blev målt som CMC-endoase- og CAVU-aktivitet som defineret ovenfor. I hvert tilfælde anvendtes 10 F1P1C2 præparatet til bedømmelse af egenskaberne hos ren Endoglucanase I.

a) endoglucanaseaktivitet af ca. 50 CMC-endoase/mg totalt protein.

b) i det væsentlige ingen cellobiohydrolaseaktivitet 15 (under 0,5 PNP-Cel/mg).

Endoglucanase I er glycosyleret, hvilket fremgår af binding til Con-A.

Immunkemisk karakterisering

Antiserum mod proteiner kan for eksempel rejses ved 20 immunisering af kaniner ifølge fremgangsmåden beskrevet af N. Axelsen et al. i: A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, kap. 23. Oprensede immunoglobuliner kan fås ud fra antiserum, f.eks. ved saltudfældning $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, efterfulgt af dialyse og 25 ionbytningskromatografi, d.v.s. på DEAE-Sephadex.

Immunkemisk karakterisering af proteiner kan udføres enten ved hjælp af Outcherlony dobbelt-diffusionsanalyse (O. Ouchterlony i: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655- 30 706), ved hjælp af krydset immunelektroforese (N. Axelsen et al., supra, kap. 3 og 4) eller ved hjælp af raket-immunelektroforese (N. Axelsen et al., kap. 2).

De fraktionerede cellulasepræparater ifølge opfindelsen (F1, F1P1, F1P1C2) viser immunologisk reaktion med serum rejst imod den rå cellulase fra DSM 1800, så vel som serum rejst mod F1P1C2.

5 Cellobiohydrolaseaktivitet (PNP-Cel)

Cellobiohydrolaseaktivitet kan måles med PNP-Cellobiose, p-Nitrophenyl-beta-D-cellobiosid (Sigma N-5759). Aktiviteten bestemmes som μmol frigjort nitrophenyl pr. minut ved 37°C ved pH 7,0.

10 Bestemmelse af Endoglucanase I ved størrelseskromatografi

Analytisk HPLC udføres på en 220 ml søjle af TSK SW 3000 med strømningshastigheden 5 ml/min af 0,1 M natriumacetatpuffer, pH 6,1. C1 eluerer ved 35 minutter, C2 ved 37 minutter (som okseserumalbumin) og C3 ved 40 minutter.

15 Oprensning af cellulase

Der anvendtes en total mængde på 228.000 CMC-endoase rå cellulase fremstillet som beskrevet i eksempel 6 i US 4.435.307. Det blev fortyndet i 20 l puffer ved pH 10,5 med ethanolamin og behandlet med 25 g DEAE-Sephadex ved 4°C i 4
20 timer. Det ikke-bundne protein blev koncentreret og frysetørret. Dette svarer til AC_xI fraktionen beskrevet i US patent 4.435.307.

Efter koncentration på en Millipore Pelicon celle med en molekylvægtsgrænse på 10.000, fik man 4000 AC_xI inde-
25 holdende 215.000 endoase. Dette underkastedes anionbytningskromatografi ved pH 10,5.

Søjlekromatografi udførtes på DEAE-Sepharose CL i en 10 x 25 cm søjle ækvilibreret med puffer 20 nM ethanolamin pH 10,5, gennemstrømningshastighed 500 ml i timen.

30 Det ikke-bundne materiale i et totalt volumen på 10.000 ml blev indstillet til pH 7,0 og koncentreret på en

Millipore Pelicon en celle med en molekylvægtsgrænse på 10.000.

Resultatet var en fraktion på 1300 ml, betegnet F1. Denne blev først mættet med 20% w/v ammoniumsulfat, og præcipitatet blev kasseret, efterfulgt af 35% w/v ammoniumsulfat. 5 Det ny præcipitat blev opsamlet ved centrifugering og opløst i vand til et totalt volumen på 130 ml, betegnet F1P1.

To gange 40 ml af dette blev tilsat en Sephacryl S-200 størrelseskromatografi: puffer 100 mM ammoniumacetat, pH 6,5, strømningshastighed 200 ml i timen, størrelse af søjlen 10 5 x 85 cm. Proteinet eluerede fortrinsvis i tre toppe: C1, C2, C3.

	Resultat	Volumen	Protein mg pr. ml	Endoase pr. ml	PNPCEL pr. ml
	AC ₁	4000	12	54	1.3
15	C1	410	2,8	22	8,8
	C2	265	5,3	100	0,5

Blødgøringseffekt i vaskeforsøg

Forsøgsbetingelser:

	Vaskemaskine:	Terg-O-tometer
20	Temperatur:	40°C
	Tid:	15 minutter
	Omdrejning:	100 rpm
	Detergent:	5 g/l "Grøn Biotex" fra Bluemøller A/S, Danmark
25	pH:	Indstillet til pH 9,0
	Hårdhedsgrad i vand:	Vandværksvand, ca. 18°dH
	Prøvemateriale:	Bomuldsfrotté, 19 cm x 19 cm A/S Georg Jensen Damaskvæveriet
30		forbehandlet som beskrevet i det følgende
	Stof/vaskeforhold:	2 stoflapper/ 1 liter pr beholder, 38/1
	Cellulase:	Se nedenfor

Cellulasedosering: I området 2,5 til 125 mg protein/l
 Skylning: Stoflapperne blev skyllet i en
 hushold- ningsmaskine (Miele W 761). Skylningen
 blev efterfulgt af centrifugering ved
 5 900 rpm i 38 sekunder
 Tørring: Lufttørring
 Antal vaske: 1

Forbehandling af prøvemateriale

100 stoflapper eller ca. 1,9 kg blev forvasket i en
 10 husholdningsvaskemaskine (Miele W 761). Vaskeprogrammet
 "Kulørt vask 60°C, kort", d.v.s. en enkeltcyklus europæisk
 vask. Stoflapperne blev centrifugeret ved 1200 rpm i slut-
 ningen af hver vaskecyklus, men ikke tørret mellem vaskene.
 Efter 20 vaske blev stoflapperne lufttørret.

15 Forskellige cellulasepræparater anvendtes, og de
 behandlede stoflappers blødhed blev sammenlignet for at finde
 den forholdsmæssige dosering af de forskellige præparater,
 som var nødvendig for at give den samme blødgøringseffekt.

Resultater

20 Cellulase	Blødgøringseffekt i sammenligning med proteinmængde
Rå cellulase	(taget som basis)
AC _x I	ca. 1 x basis
25 F1 _x	ca. 2 x basis
F1P1	ca. 3 x basis
F1P1C2	ca. 5 x basis

Det ses, at de tre fraktionerede præparater (F1,
 F1P1, F1P1C2) viste forbedret blødgøringseffekt.

Eksempel 2Oprensning og vaskeforsøg ved anvendelse af cellulaser fra *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum stamme J 79 (deponeringsnummer 5 DSM 2672) blev dyrket ved 30°C på et agarsubstrat indeholdende følgende næringsmidler:

Gærekstrakt Difco	4 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
10 Glucose	15 g
Destilleret vand	1000 ml
Agar	15 g

Kulturen blev inkuberet i 6 dage i en Fernbach kolbe, hvorefter de resulterende sporer blev transformeret til en 500 l rustfri stålfermenteringsbeholder indeholdende 300 liter præfermenteringssubstrat af følgende sammensætning:

Majsstøbevand	23,3 g pr liter
Glucose	24,0 g pr liter
CaCO ₃	5,0 g pr liter
20 Pluronsyre	0,1 ml pr liter

(pH i mediet blev indstillet til 5,5 med H₃PO₄ inden sterilisering ved 121°C i 60 minutter). Den resulterende kultur blev beluftet, idet der anvendtes 300 liter luft pr. minut ved et tryk på 0,5 atm.

25 Efter dyrkning i 23 timer ved 30°C anvendtes 150 liter af den tætte kultur til at pøde en fermenteringsproduktionstank indeholdende 1500 liter af et medium steriliseret ved pH 6,5 ved 121°C i 60 minutter og indeholdende følgende ingredienser:

30 Majsstøbevand	20 g pr liter
Cellulosepulver, Diacell	40 g pr liter
KH ₂ PO ₄	10 g pr liter

CaCO ₃	5 g pr liter
NH ₄ NO ₃	10 g pr liter
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g pr liter
Pluronsyre	0,1 ml pr liter

5 Fermentateringsblandingen blev beluftet med 750-1500 liter luft i minuttet ved et tryk på 0,5 atm og omrystet ved en hastighed på 200 rpm. Temperaturen var 30°C, og pH blev holdt på 6,0 ved tilsætning af 4,9% phosphorsyre i de første 40 timer af fermenteringstiden og efter 70 timer holdt over 10 5,0 ved tilsætning af fortyndet calciumcarbonat. Efter 108 timer standsedes fermenteringen, kulturen blev nedkølet til 5°C, dyrkningsmediet blev fjernet fra filtret, og til slut blev filtratet frysetørret efter koncentration ved ultrafiltrering.

15 10 gram frysetørret cellulasepulver (som havde en total CMC-endoaseaktivitet på 18.118 enheder) blev underkastet kromatografi på 350 ml DEAE-Sepharose type CL-6B, indkøbt hos Pharmacia Company med 600 ml lineær gradient af 1 M NaCl i 50 mM Tris puffer ved pH 7. Fraktioner (20 ml) fra 20 kromatografien blev samlet sammen, koncentreret på en Amicon ultrafiltreringsmembranreaktor med en membran af typen GR 81 PP med en molekylvægtsgrænse på 10 kDalton indkøbt fra De Danske Sukkerfabrikker og til slut analyseret som vist i tabellen nedenfor:

25	Pulje	ml	E.280	Total mg protein	Endoase pr ml	Total endoase	Endoase/ mg protein
	1	58,8	52,2	3070	329	19.369	6,3
	2	18,8	15,2	286	14	254	0,9
	3	24,2	6,0	145	22	527	3,7
30	4	33	40	1320	11	363	0,3

Pulje 1, som ikke bandt til anionbytningsøjlen, udviste en CAVU aktivitet på 87%. I SDS PAGE viste den et større bånd med en molekylvægt på 80 kDalton. Ved afprøvning i vaskeforsøg (som beskrevet i eksempel 1) med et simpelt 35 detergent på pH 8 og en CMC-endoase aktivitet fra 60 enheder

pr liter vaskevæske udviste proteinet i dette bånd en fremragende blødgøringseffekt.

Eksempel 3

Oprensning og vaskeforsøg med cellulaser fra *Myceliophthora*

5 thermophile

Stammen CBS 11765 (*Myceliophthora thermophile*) blev dyrket ved 37°C på et agarsubstrat med følgende sammensætning:

	Gærekstrakt Difco	4 g
10	K ₂ HPO ₄	1 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
	Glucose	15 g
	Destilleret vand	1000 ml
	Agar	15 g

- 15 Kulturen blev inkuberet i seks dage i en Fernbach kolbe. Derpå blev sporerne overført til en 500 l rustfri stålfermenteringsbeholder indeholdende 280 liter af et medium bestående af følgende:

	Sojabønneemel	28,9 g pr liter
20	K ₂ HPO ₄	2,1 g pr liter
	CaCO ₃	5,0 g pr liter
	Pluronsyre	0,4 ml pr liter
	Glucose	4,3 g pr liter
	Citronsyre	6,7 g pr liter

- 25 (Glucosen og citronsyren i mediet blev steriliseret separat ved 123°C i 60 minutter. pH i mediet blev indstillet til 5,5 med H₃PO₄ inden sterilisering ved 123°C i 90 minutter). Steril luft blev ledt gennem kulturen ved et tryk på 0,5 atm og med en hastighed på 200 liter pr min.

- 30 Efter dyrkning i 48 timer ved 37°C anvendtes 120 liter af den tætte kultur til podning af en enzymproduktions-tank indeholdende 1500 liter af et substrat med følgende sammensætning:

Sojabønneemel	30 g pr liter
Cellulosepulver, Solkafloc	20 g pr liter
KH_2PO_4	2 g pr liter
CaCO_3	4,5 g pr liter
5 Pluronsyre	0,17 ml pr liter

(mediets pH blev indstillet til 6,5 med $\text{NaOH}/\text{H}_3\text{PO}_4$ inden sterilisering ved 123°C i 90 minutter)

Kulturen blev beluftet med en hastighed på 1500 liter i minuttet under et tryk på 0,5 atm og omrystet med en 10 hastighed på 250 rpm. Fermenteringen blev fortsat i 64 timer ved 37°C , hvorefter kulturen blev nedkølet til 5°C og filtreret. Filtratet blev frysetørret efter koncentration ved ultrafiltrering.

5 g cellulasepulver (som havde en CMC-endoase-15 aktivitet på 6176 enheder pr gram) blev fraktioneret med søjlemateriale af typen Sephacryl S 200 og en 0,1 M natriumacetatpuffer ved pH 6,1. Fraktioner på 15 ml blev opsamlet, analyseret med SDS elektroforese og fordelt ifølge gelernes proteinmønstre som følger:

20 pulje 1	475 ml, SDS gel:	100, 90 kDalton
pulje 2	500 ml, SDS gel:	70, 50, 45 kDalton
pulje 3	400 ml, SDS gel:	70, 60, 50, 45 kDalton
pulje 4	410 ml, SDS gel:	45, 30 kDalton
pulje 5	310 ml, SDS gel:	65, 50, 18 kDalton
25 pulje 6	850 ml, SDS gel:	65, 50, 40, 18 kDalton

Puljerne blev derpå koncentreret på en Amicon membranreaktor med en ultrafiltreringsmembran af typen GR 81 PP indkøbt hos De Danske Sukkerfabrikker, molekylvægtsgrænse 10 kDalton, og de blev derpå analyseret som følger:

	Pulje	ml	E.280	Total mg protein	Endbase pr ml	Total endbase	Endbase/ mg protein
	1	13,0	17,6	229	74	956	4,2
	2	18,3	23,1	423	372	6803	16,1
5	3	11,8	16,2	191	139	1645	8,6
	4	20,0	18,3	366	196	3929	10,7
	5	11,6	22,6	262	286	3318	11,6
	6	21,0	20,0	420	252	5292	12,6

Følgende CAVU aktiviteter blev målt:

10	Pulje 2	23% CAVU
	Pulje 3	22% CAVU
	Pulje 4	13% CAVU
	Pulje 5	75% CAVU
	Pulje 6	88% CAVU

15 Ved afprøvning i vaskeforsøg (som beskrevet i eksempel 1) med et enkelt detergent med pH 8 og en CMC-endoaseaktivitet på 180 enheder pr liter vaskevæske havde kun puljerne 5 og 6 en udmærket blødgøringseffekt. Derimod havde pulje 2, som har en CMC-endoaseaktivitet på 16 enheder/mg, 20 ikke nogen blødgøringseffekt ved afprøvning.

PATENTKRAV

1. Cellulasepræparat, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter mindst 50% (vægt% af det totale cellulase-indhold) af en i det væsentlige homogen endoglucanasekompo-
5 nent med følgende egenskaber:

(a) en CMC-endoaseaktivitet [defineret som endoglucanaseaktiviteten af endoglucanasekomponenten udtrykt ved evnen til at nedsætte viskositeten i en carboxymethylcellulose (CMC) opløsning, som bestemt ved fremstilling af en substrat-
10 opløsning på 35 g/l CMC i 0,1 M tris puffer ved pH 9,0, opløsning af en prøve af cellulasepræparatet i den samme puffer, blanding af 10 ml af substratopløsningen og 0,5 ml af enzymopløsningen og overføring af blandingen til et viskosimeter thermostatteret ved 40°C, hvor 1 enhed CMC-endoaseakti-
15 vitet er defineret som den mængde enzym, der nedsætter viskositeten af CMC opløsningen til halvdelen efter 30 minutter] på mindst 5 CMC-endoaseenheder pr. mg totalt protein,

(b) en CAVU aktivitet [defineret som affiniteten af endoglucanasekomponenten for cellulose, som bestemt ved tilsætning
20 af ca. 50 CMC-endoaseenheder i 10 ml tris puffer, pH 9,0, til 2,5 g Avicel®, omrøring af suspensionen i 30 minutter ved stuetemperatur, centrifugering i 10 minutter ved 3000 rpm og måling af CMC-endoaseaktiviteten i supernatanten, hvor % CAVU aktivitet beregnes som forskellen mellem total CMC-endoaseak-
25 tivitet af henholdsvis den originale opløsning og supernatanten divideret med den totale CMC-endoaseaktivitet og ganget med 100] på mindst 50% under basiske betingelser, og

(c) et pH-optimum ved pH ca. 7,5-10,

og at cellulasepræparatet i det væsentlige ikke udviser nogen
30 cellobiohydrolaseaktivitet.

2. Cellulasepræparat ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved, at det omfatter mindst 90% (vægt% af det totale
cellulaseindhold) af endoglucanasekomponenten.
3. Cellulasepræparat ifølge krav 1, k e n d e t e g-
5 n e t ved, at endoglucanasekomponenten udviser en CMC-
endoaseaktivitet på over ca. 10, fortrinsvis over ca. 15,
CMC-endoaseenheder pr. mg totalt protein.
4. Cellulasepræparat ifølge krav 3, k e n d e t e g-
n e t ved, at endoglucanasekomponenten udviser en CMC-
10 endoaseaktivitet på ca. 50 eller flere CMC-endoaseenheder pr.
mg totalt protein.
5. Cellulasepræparat ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved, at endoglucanasekomponenten udviser en CAVU-
aktivitet på over ca. 65%, fortrinsvis over ca. 75%.
- 15 6. Cellulasepræparat ifølge et hvilket som helst af
kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at endoglucanase-
komponenten er fremstillet af en svamp.
7. Cellulasepræparat ifølge krav 6, k e n d e t e g-
n e t ved, at svampen er en art af Humicola, især Humicola
20 insolens.
8. Cellulasepræparat ifølge krav 7, k e n d e t e g-
n e t ved, at endoglucanasekomponenten udviser følgende
egenskaber:
- a) omtrentlig molekylvægt på ca. 65 kD (SDS-PAGE)
 - 25 b) isoelektrisk punkt på ca. 8,5-9,5
 - c) endoglucanaseaktivitet på over ca. 50 CMC-endoase-
enheder/mg totalt protein
 - d) immunologisk reaktion med et polyspecifikt antistof
rejst mod cellulase hidrørende fra Humicola insolens
30 DSM 1800.

9. Cellulasepræparat ifølge krav 6, k e n d e t e g-
n e t ved, at endoglucanasekomponenten er fremstillet fra
en *Fusarium* sp., især *Fusarium oxysporum*, en *Myceliophthora*
sp., især *Myceliophthora thermophila*, en *Erwinia* sp., en
5 *Microbispora* sp., en *Neocallimastix* sp., en *Piromonas* sp.
eller en *Robillarda* sp.
10. Cellulasepræparat ifølge et hvilket som helst af
kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at endoglucanase-
komponenten er fremstillet af en bakterie.
- 10 11. Cellulasepræparat ifølge krav 10, k e n d e t e g-
n e t ved, at bakterien er en art af *Streptomyces* eller
Clostridium.
12. Detergentadditiv omfattende et cellulasepræparat
ifølge et hvilket som helst af kravene 1-11, k e n d e t e g-
15 n e t ved, at det er i form af et støvfrit granulat,
stabiliseret væske eller beskyttede enzymer.
13. Detergentadditiv ifølge krav 12, k e n d e t e g-
n e t ved, at det udviser en CMC-endoaseaktivitet på 500-
10.000 CMC-endoaseenheder pr. g additiv.
- 20 14. Detergentadditiv ifølge krav 12, k e n d e t e g-
n e t ved, at det yderligere omfatter et andet enzym såsom
en protease, lipase og/eller amylase.
15. Detergentkomposition, k e n d e t e g n e t ved,
at den omfatter et cellulasepræparat ifølge et hvilket som
25 helst af kravene 1-11.
16. Detergentkomposition ifølge krav 15, k e n d e-
t e g n e t ved, at den udviser en CMC-endoaseaktivitet på
ca. 0,3-400 CMC-endoaseenheder pr. g detergent.
17. Detergentkomposition ifølge krav 15, k e n d e-

t e g n e t ved, at den yderligere omfatter et andet enzym såsom protease, lipase og/eller amylase.

18. Fremgangsmåde til nedsættelse af hastigheden, hvormed bomuldsholdige tekstiler bliver ru, eller til reduktion af ruheden i bomuldsholdige tekstiler, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter behandling af bomuldsholdige tekstiler med et cellulasepræparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1-11.

19. Fremgangsmåde ifølge krav 18, k e n d e t e g n e t ved, at behandlingen af tekstilerne med cellulasepræparatet udføres under iblødsætning, vask eller skylning af tekstilerne.