

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 915671 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **915671**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁵)
C11D 3/386
C12N 9/96

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.05.1990**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.12.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.12.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **30.05.1990 PCT/EP1990/000863**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

08.06.1989 DE 3918761

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Henkel Kommanditgesellschaft Auf Aktien, Henkelstrasse 67, 4000 Düsseldorf 13, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Weiss, Albrecht, BRD, SAKSA, (DE)

2 •Maurer, Karl-Heinz, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Juokseva entsyymitiiviste

Flytande enzymkoncentrat

Juokseva entsyymitiiviste. - Flytande enzymkoncentrat.

Esillä oleva keksintö kohdistuu juoksevaan entsyymitiivisteseen, jota voidaan käyttää raaka-aineliuksena valmistettaessa juoksevia pesuaineita tai vastaavia.

On tunnettua lisätä pesuaineisiin, myös juokseviin pesuaineisiin, entsyymejä, erityisesti proteaaseja. Kiinteisiin pesuaineisiin lisäystä varten muokataan entsyymit kiinteiksi raemaisiksi valmisteiksi. Juoksevien pesuaineiden kehittyessä on syntynyt tarve valmistaa myöskin tällaisia valmisteita varten varastointikelpoisia perusliuoksia, jotka sitten seuraavassa käsittelyvaiheessa voidaan lisätä nestemäiseen pesuaineeseen. Hydrolaasien, erityisesti proteaasien, entsyymiliuokset eivät kuitenkaan ole sellaisenaan varastointikelpoisia. Tämä pätee erityisesti sellaisille entsyymiliuoksille, jotka on tarkoitettu lisätä juokseviin pesuaineisiin, koska entsyymiliuoksen puhdistuksessa ilmeisesti poistetaan epäpuhtauksien lisäksi myös aineita, jotka vaikuttavat stabiilisuuteen.

Alan kirjallisuudessa on jo esitetty joukko ehdotuksia, miten entsyymit juoksevissa pesuaineissa voidaan stabilisoida. Koska kuitenkin juoksevissa pesuaineissa entsyymipitoisuus, verrattuna muihin aineisiin, esimerkiksi tensideihin, on erittäin pieni ja näin vallitsevat täysin erilaiset olosuhteet, ei näitä tuloksia voida soveltaa entsyymitiivisteisiin.

Siten US-patenttijulkaisussa 3 781 212 ehdotetaan juoksevaa pesuainetta, jossa entsyymin stabiloimiseksi on käytetty polyolia yhdessä boorihapon kanssa. Tällöin suhteen polyoli:boorihappo on oltava pienempi kuin 1, toisin sanoen boorihappoa käytetään ylimäärin polyoliin verrattuna.

Saksalaisessa hakemusjulkaisussa DE 31 25 533 kuvataan vesi-pitoista rakenneainetta sisältävää juoksevaa pesuainetta, jossa on entsyymejä, pesuaktiivisia aineita, polyolia ja boorihappoa tai sen suolaa painosuhteissa polyoli:boorihappo suurempi kuin 1, jolloin lisäksi on lisätty yksi osa verkostettua polyakrylaattia. Muiden polyolien joukossa mainitaan 1,2-propaanidioli ja muiden booriyhdisteiden joukossa myös boorihappo ja sen suolat. Edellytetään, että polyolin määrän pitää olla 100 - 200 paino-% boorihapon määrästä. Edullisesti se on 100 - 160 paino-% boorihapon määrästä. Hydrolaasiosuus juoksevasta pesuaineesta on yleensä kuitenkin ainoastaan 0,1 paino-% proteiinia, parhaassa tapauksessa korkeintaan 0,5 paino-%.

Mainitusta saksalaisesta patenttihakemuksesta ei voida vetää mitään johtopäätöstä siitä, miten stabiili entsyyminestetiiviste voitaisiin aikaansaada. Näin keksinnön tehtävänä on aikaansaada tällainen juokseva tiiviste.

Keksinnön kohteena on juokseva entsyymitiiviste, joka perustuu fermentoinnilla saatuun solumassasta ja ainakin osittain liukenevista epäpuhtauksista vapautetusta hydrolaasiliuoksesta, jonka entsyymipitoisuus on 30 000 - 400 000 hydrolaasiyksikköä sisältäen:

- 1,5 - 20 paino-% hydrolaasia
- 20 - 40 paino-% propyleeniglykolia ja
- 0,5 - 5 paino-% boorihappoa ja/tai sen liukoisia suoloja sekä toivomuksen mukaan:
- 0,5 - 5 paino-% 1-3-emäksisen karboksyylihapon, jossa on korkeintaan 6 C-atomia, suolaa.

Eräässä keksinnön edullisessa sovellutusmuodossa keksinnön mukaiset juoksevat entsyymitiivisteet ovat väkevöityjä, fermentoinnilla saatuja ja ainakin osittain puhdistettuja entsyymiliuoksia, jotka keksinnön mukaan lisättyjen stabi-

lointiaineiden ja fermentoinnissa läsnäolevien ja muodostuneiden aineiden lisäksi eivät sisällä muita ainesosia.

Stabilointiaineena käytetään keksinnön mukaisesti propyleeniglykolin ja boorihapon ja/tai sen suolojen yhdistelmää. Propyleeniglykolin (1,2-propaanidiolin) määrä on 20 - 40 paino-%, erityisesti 20 - 30 paino-%. Boorihapon määrä on 0,5 - 5 paino-%, erityisesti 1 - 3 paino-%.

Paino-%-määrät boorihapon kohdalla tarkoittavat happoa, myöskin siinä tapauksessa, että sitä käytetään sen suolaliuoksen muodossa, jolloin läsnä on korkeampia painomääriä.

1-3-emäksisen karboksyylihapon, jossa on korkeintaan 6 C-atomia, suolana voidaan lisätä liukoisia vastaavan karboksyylihapon alkalimetalli- tai ammoniumsuoloja. Näin voidaan käyttää muurahaishapon, propionihapon, malonihapon, maleiinihapon tai fumaarihapon suoloja. Suolojen tavanomaiset pitoisuudet laskettuna kokonaisvalmisteesta ovat välillä 0,5 - 5 paino-%. Näin on esimerkiksi saatu edullisia tuloksia 1 paino-%:lla muurahaishappoa tai 1 paino-%:lla maleiinihappoa, kukin natriumsuolan muodossa.

Koska joukko hydrolaasiliuoksia tietyllä pH-arvolla ovat pysymättömiä, on edullista, että boorihappoa käytetään suolana, toisin sanoen entsyymiliuos säädetään ennen boorihapon lisäystä, sen jälkeen tai sen aikana pH-arvoon välillä 6 - 8. Sopivia boorihapposuoloja ovat alkalimetalli- tai ammoniumsuolat, erityisesti natrium- tai kaliumsuolat.

Lähtöentsyymiliuoksena voidaan keksinnön mukaisesti käyttää entsyymiliuoksia, jotka on saatu fermentoimalla hiivaa tai bakteereja, jotka kykenevät muodostamaan hydrolaasia. Suositeltavia ovat liuokset, jotka hydrolaaseina sisältävät proteaasia, erityisesti Subtilisin-proteaasia, näiden joukossa

suositellaan sellaisia, jotka perustuvat Subtilisin Carlsberg:iin tai Subtilisin BBN':iin.

Keksinnön mukaisen entsyymitiivisteen valmistamiseksi erotetaan fermentointiliuoksesta soluosuus ja sitten väkevöidään entsyymi. Tämä voidaan esimerkiksi suorittaa mikro- ja ultrasuodatuksen yhdistelmällä tai myös saostus- ja flokkulointivaiheilla, joita mahdollisesti seuraa vesiliuoksen haihdutus.

Näin saatuun jälkeempään puhdistettuun entsyymiliuokseen lisätään 1,2-propaanidiolia ja boorihappoa. Kriittisen pH:n, joka monella hydrolaasilla jo on 4, alituksen välttämiseksi, voidaan ennen boorihapon lisäystä tai sen aikana natronlipeällä säätää toivottu pH välille 6 - 8.

Keksinnön mukaiset valmisteet voivat lisäksi myös sisältää säilöntäainetta. Monissa tapauksissa tämä ei ole välttämätöntä, koska jo propyleeniglykolin ja boorihapon yhdistelmä vaikuttaa säilyvästi. Sopiva säilöntäaine on esimerkiksi formaldehydi.

Keksintö johtuu boorihapon ja propyleeniglykolin synergisestä stabilointivaikutuksesta tällaisiin entsyymeihin, joka annettujen rajojen puitteissa muodostaa erityisen edullisia stabilointiarvoja, kuten seuraavista esimerkeistä ilmenee.

ESIMERKIT

Esimerkki 1.

Liuos, jossa oli Subtilisin Carlsberg-proteaaasia, jonka aktiivisuus oli 130 EP-yksikköä/g, inkuboitiin polypropyleeniglykolimäärillä 0, 20, 30 ja 50 paino-% ja 60°C:ssa sille tehtiin nopeutettu vanhenemiskoe. 24 tunnin jälkeen mitattiin seuraavat jäännösaktiivisuudet:

ilman	20 paino-%	30 paino-%	50 paino-%
propyleeni-	propyleeni-	propyleeni-	propyleeni-
glykolia	glykolia	glykolia	glykolia
pienempi kuin 5	23	25	16

Esimerkki 2

Koe toistettiin, jolloin seokseen, jossa oli 20 paino-% propyleeniglykolia, lisäksi lisättiin 1, 3 ja 5 paino-% natriummetaboraattia. 24 tunnin jälkeen mitattiin seuraavat jäännösaktiivisuudet prosentteina:

- 1 % metaboraatti 50 %.
- 3 % metaboraatti 46 %.
- 5 % metaboraatti 34 %.

Esimerkki 3

Koe toistettiin, jolloin lisättiin:

- 1 paino-% natriummetaboraattia
- 30 paino-% propyleeniglykolia ja
- 1 paino-% muurahaishappoa tai maleiinihappoa

100 minuutin säilytyksen jälkeen 60°C:ssa ei voitu havaita mitään aktiivisuuden vähennystä, sitä vastoin ilman karboksyylihapposuolan lisäystä aktiivisuus aleni 84 %.

Entsyymiaktiivisuuden mittaaminen suoritettiin kaikissa tapauksissa niin sanotulla EPE-menetelmällä, joka on kuvattu saksalaisessa patenttihakemuksessa DE 37 34 047. Mittausperiaatteena on N-CBZ-aminohappo-p-nitrofenyyliesterin fenolisen esterisidoksen katkaiseminen 25°C:ssa ja pH-arvossa 6,0, jolloin muodostuneen p-nitrofenolin pitoisuus määriteltiin fotometrisesti kohdassa 340 nm.

Patenttivaatimukset

1. Juokseva entsyymitiiviste, joka perustuu fermentoinnilla saatuun solumassasta ja ainakin osittain liukoisista epäpuh-
tauksista vapautuneeseen hydrolaasiliuokseen, jonka entsyymi-
pitoisuus on 30 000 - 400 000 EPE-hydrolaasiyksikköä sisältäen

- 1,5 - 20 paino-% hydrolaasia
- 20 - 40 paino-% propyleeniglykolia ja
- 0,5 - 5 paino-% boorihappoa ja/tai sen liukoista suolaa
(laskettuna boorihappona)

ja mahdollisesti:

- 0,5 - 5 paino-% 1-3-emäksisen karboksyylihapon, jossa on
korkeintaan 6 C-atomia, suolaa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen juokseva entsyymitiiviste,
t u n n e t t u siitä, että hydrolaasina käytetään proteaasia,
erityisesti Subtilisin-proteaasia.

3. Jonkin patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen juokseva entsyy-
mitiiviste, t u n n e t t u siitä, että propyleeniglykolia on
läsnä 20 - 30 paino-%, laskettuna juoksevasta entsyymitiivis-
teestä.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen juokseva entsyy-
mitiiviste, t u n n e t t u siitä, että boorihappoa ja/tai
sen suolaa on 1 - 3 paino-% (laskettuna boorihappona) ja
laskettuna juoksevasta entsyymitiivisteestä.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen juokseva entsyy-
mitiiviste, t u n n e t t u siitä, että boorihappo on
natrium-, kalium- tai ammoniumsuolan muodossa.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen juokseva entsyy-
mitiiviste, t u n n e t t u siitä, että sen pH-arvo on
välillä 6 - 8.

Patentkrav

1. Flytande enzymkoncentrat på basis av en genom fermentation erhållen från cellmassor och åtminstone delvis från föroreningar befriad hydrolaslösning med en enzymhalt på 30 000 - 4000 EPE-hydrolasenheter innehållande
 - 1,5 - 20 vikt-% hydrolas
 - 20 - 40 vikt-% propylenglykol och
 - 0,5 - 5 vikt-% borsyra och/eller dess lösliga salter (beräknad som borsyra)
 och eventuellt:
 - 0,5 - 5 vikt-% salt av 1 till 3 basiska karbonsyror med högst 6 C-atomer.
2. Flytande enzymkoncentrat enligt patentkravet 1, k ä n - n e t e c k n a t därav, att som hydrolaser används proteaser, särskilt Subtilisin-proteaser.
3. Flytande enzymkoncentrat enligt något av patentkraven 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att propylenglykol förekommer i en mängd av 20 - 30 vikt-%, beräknad på det flytande enzymkoncentratet.
4. Flytande enzymkoncentrat enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att borsyra och/eller dess salt förekommer i en mängd av 1 - 3 vikt-% (beräknad som borsyra) och med avseende på det flytande enzymkoncentratet.
5. Flytande enzymkoncentrat enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att borsyran föreligger som natrium-, kalium- eller ammoniumsalt.
6. Flytande enzymkoncentrat enligt något av patentkraven 1 - 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att det uppvisar ett pH-värde på mellan 6 - 8.