



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147528 B**

DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **5103/77**

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>: **C 11 D 7/42**

(22) Indleveringsdag: **17 nov 1977**

(24) Løbedag: **18 nov 1975**

(41) Alm. tilgængelig: **17 nov 1977**

(44) Fremlagt: **17 sep 1984**

(86) International ansøgning nr.: —

(62) Stamansøgning nr.: **5185/75**

(30) Prioritet: **19 nov 1974 GB 50044/74**

(71) Ansøger: **\*GIST-BROCADES N.V.; Delft, NL.**

(72) Opfinder: **Bauke te \*Nijenhuis; NL.**

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau**

(54) **Vaskemiddelkomposition og fremgangsmåde til  
dens fremstilling**

LN 147528 B

## 1

Opfindelsen angår en vaskemiddelkomposition, der indeholder et proteolytisk enzymprodukt med høj virkning i det alkaliske område, samt fremgangsmåde til dens fremstilling.

- 5           Proteolytiske enzymer, der har høj proteolytisk virkning i det alkaliske område, er velkendt. Vedder beskriver i Antonie van Leeuwenhoek, 1 (1934) 141-147 en ny mikroorganisme, som han kalder Bacillus alcalophilus, der er i stand til at nedbryde gelatine og
- 10 hæmoglobin i et stærkt alkalisk medium. Denne egenskab hos mikroorganismen kan tilskrives et enzym, som senere undersøgelser har vist (jvf. engelsk patentbeskrivelse nr. 1.205.403). Enzymer med stor virkning i alkaliske midler er også beskrevet . adskillige andre steder i
- 15 litteraturen, bl.a. i engelsk patentbeskrivelse nr. 1.243.784 og hollandsk patentansøgning nr. 72.07050, der omhandler adskillige proteolytiske enzymer produceret af medlemmer af slægten Bacillus, der er virksomme i vaskemiddelkompositioner, som normalt er alkaliske, når
- 20 de opløses i vaskevæsker.

          Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes der en vaskemiddelkomposition med et enzymprodukt, der har høj proteolytisk virkning i alkaliske medier, som gør det overordentlig velegnet til at in-

25 korporeres i vaskemiddelkompositioner.

          Vaskemiddelkompositionen ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at den indeholder en virksom mængde af et enzymprodukt, der er karakteristisk ved

- a)       at det har optimal proteolytisk aktivitet ved en
- 30 pH-værdi over 12, idet aktiviteten måles overfor denatureret hæmoglobin i overensstemmelse med Anson-metoden,
- b)       at det består af mindst to proteolytisk aktive komponenter, der viser et karakteristisk zymogram ved
- 35 pladeelektroforese som vist på tegningen,

c) at de to hovedkomponenter har følgende amino-syresammensætning:

|    |               | Komponent A | Komponent B |
|----|---------------|-------------|-------------|
|    | Lysin         | 6           | 6           |
| 5  | Histidin      | 7           | 6           |
|    | Arginin       | 9           | 8           |
|    | Asparaginsyre | 27          | 28          |
|    | Threonin      | 16          | 16          |
|    | Serin         | 30          | 30          |
| 10 | Glutaminsyre  | 15          | 15          |
|    | Prolin        | 12          | 13          |
|    | Glycin        | 31          | 33          |
|    | Alanin        | 36          | 36          |
|    | Cystin        | 0           | 0           |
| 15 | Valin         | 22          | 22          |
|    | Methionin     | 3           | 3           |
|    | Isoleucin     | 8           | 9           |
|    | Leucin        | 18          | 18          |
|    | Tyrosin       | 7           | 6           |
| 20 | Phenylalanin  | 2           | 2           |
|    | Tryptophan    | 3           | 3           |

d) at de to hovedkomponenter har følgende fysiske egenskaber:

|    |                    |        |        |
|----|--------------------|--------|--------|
| 25 | isoelektrisk punkt | 10,5   | 10,5   |
|    | molekylvægt        | 25.500 | 25.500 |

e) og at der er identisk med det proteolytiske enzymprodukt, der kan isoleres fra et dyrkningssubstrat fremkommet ved dyrkning af *Bacillus nov.spec.* PB 92, 30 hvorefter en kultur er deponeret i Laboratoriet for Mikrobiologi ved Det Tekniske Universitet i Delft, Holland, under aerobe betingelser i et substrat, indeholdende sædvanlige carbon- og energikilder, en nitrogenkilde, calcium- og magnesiumsalte og sporelementer.

35 Det nævnte enzymprodukt kan fremstilles med forbløffende højt udbytte af den omtalte *Bacillus*-stamme. Udbytterne er større end de, der opnås med eksempelvis en *Bacillus firmus* stamme, jvf. beskrivelsen til hollandsk patentansøgning 72.07050.

En anden uventet fordel ved den foreliggende opfindelse er, at enzymproduktet viser en forbløffende god vaskeevne i perboratholdige vaskemiddelkompositioner.

Vaskemiddelkompositionen ifølge opfindelsen  
5 indeholder fortrinsvis det nævnte enzymprodukt sammen med et tensid, et vandblødgøringsmiddel, et alkali-metalsilicat, et alkalimetaltbicarbonat og eventuelt et alkalimetallperborat.

Opfindelsen angår som før nævnt også en frem-  
10 gangsmåde til fremstilling af den omhandlede vaskemiddelkomposition, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at det ovenfor definerede enzymprodukt blandes med de i kompositionen indgående vaskemiddelkomponenter.

15       Undersøgelser af enzymproduktets egenskaber omtales mere detaljeret i det følgende:

Egenskaber ved enzymproduktet:

a) Forholdet mellem pH/virkning.

Til bestemmelse af pH/virkningsforholdet an-  
20 vendes Anson hæmoglobinmetoden (jvf. J. Gen. Physiology, 22 (1939), 79-89) så nært som muligt. Specifikationer, der ikke er givet i Anson litteraturen, anføres nedenfor:

Substrat-fremstilling: Oksehæmoglobin, protease-  
25 substrat ifølge Anson, lyofiliseret, rent, opnået fra SERVA, Heidelberg, Tyskland.

Substrat-opløsning: SERVA hæmoglobin blandedes med vand ved omrøring til opnåelse af en 22%'s opløsning (vægt/volumen). Ud fra denne frisk fremstillede  
30 koncentrerede opløsning fremstilledes en fortyndet opløsning indeholdende 8 ml 1 N natriumhydroxid, 72 ml vand, 36 g urinstof og 10 ml af den koncentrerede opløsning. Denne alkaliske opløsning holdtes ved 25°C i 60 minutter for at denaturere hæmoglobinet.

35       Bufferopløsninger (se nedenfor), urinstof og merthiolat tilsattes, og pH indstilledes, idet man anvendte en Ingold HA elektrode. Volumenet indstilledes til en hæmoglobinkoncentration på 2,2%.

pH-Referenceopløsningerne opnået hos Merck, Darmstadt, Tyskland (Buffer-Titrisol 8,00, 9,00, 10,00, 11,00 og 12,00).

Man anvendte et Philips digital pH-meter (PW 5 9408).

Til buffersammensætningen af substratopløsningen med pH 8 fulgtes beskrivelsen for trypsinbestemmelse. Sammensætningen af de andre bufferopløsninger blev taget fra Dawson et al jvf. "Data for Biochemical 10 Research", 2. udgave (1969) Oxford, siderne 475 og følgende

Komponenterne sættes til substratopløsningen, indtil man fik de slutkoncentrationer, der er angivet nedenfor:

- 15        pH-område 8,3 - 10,3: glycine - NaOH 0,05 M  
          pH-område 10,8 - 11,3:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - NaOH 0,025 M  
          pH-område 11,7 - 12,5: KCl - NaOH 0,05 M

Enzymopløsning: Opløsningerne frisk-fremstilledes i vand. Man fremstillede fortyndinger heraf, idet 20 koncentrationen var 200 DU/ml. Betegnelsen DU betyder Delft-enheder, idet man refererer til en metode til bestemmelse af enzymaktivitet, der er beskrevet i engelsk patentbeskrivelse nr. 1.353.317.

Inkubering: Hver analyse bestod af to be- 25 stemmelser og en kontrol. Substrat- og enzymopløsninger anbragtes i vandbad ved 25°C. Substratopløsningernes pH bestemtes ved hjælp af en Ingold HA elektrode og også ved hjælp af en Ingold LOT elektrode til be- stemmelse af pH-værdier under 11,00. Man anvendte 30 titrisol pH-referenceopløsninger hele vejen igennem. Til 2,5 ml af substratopløsningen anbragt i et centrifugeglas sættes 0,5 ml af en enzymopløsning. Man sikrede sig tilstrækkelig blanding ved at omrøre lige efter med en glasspatel. Kontrollen, uden enzym, blev også 35 inkuberet.

Inkuberingen afsluttedes efter 10 minutter ved tilsætning af 5 ml 0,3 N trichloreddikesyre. Kontrollen fik tilsat 5 ml trichloreddikesyreopløsning og 0,5 ml

enzymopløsning. Trichloreddikesyreopløsningen blev tilsat ved hjælp af en ZIPPETTE (Jencons, Hemel Hempstead, Hertfordshire). Blandingen omrørtes kraftigt ved hjælp af glasspatelen, idet den stadig var i 5 centrifugeglasset. Glasset anbragtes i et vandbad ved 2°C.

pH-Ændringen under inkuberingen fulgtes ved at måle pH ved begyndelsen og afslutningen af inkuberingen, idet man anvendte en LOT-elektrode til inkuberings- 10 værdier under 11,0 og en HA-elektrode til pH-værdier over 11,0. pH-Ændringen var på mindre end 0,1 pH-enhed for inkubering af enzymopløsninger, der indeholdt 50 eller mindre DU/ml og mindre end 0,15 pH-enheder for inkuberinger af enzymopløsninger, der indeholdt 200 15 eller 500 DU/ml. Middelværdierne målt med Ingold HA-værdier som basis.

Centrifugering: Rørene centrifugeredes med en acceleration på 6000 g, efter at de var blevet holdt mindst 30 minutter ved 2°C.

20 Farveudvikling: Farveudvikling udførtes i et vandbad ved 25°C.

5 ml af supernatanten blev sat til 10 ml 0,5 N NaOH, og blandingen omrørtes straks, idet man anvendte en VORTEX-GENIE (Scient. Industr., U.S.A.). Efter nøjagtig 25 2 minutters forløb sættes 3 ml phenolreagens til blandingen ved hjælp af en Zippette under kontinuerlig omrøring. Phenolreagenset var Merck's Folin-Ciocalteus Phenolreagens, fortyndet med 2 rumfang vand.

Farven målt ved hjælp af et ZEISS M4 QIII 30 spektrofotometer med spalteautomatisering ved 750 nm præcis 6 minutter efter Folintilsætningen. Som reference for farveudviklingen anvendtes en tyrosinopløsning, der indeholdt  $8 \times 10^{-7}$  ækvivalenter tyrosin i 5 ml 0,2 N HCl med 0,5 vægtvolumen-% formaldehyd. Referencefarveudviklingen undersøgte 35 regelmæssige mellemrum, men afvigelser fra middelværdien overskred aldrig 1% for en prøve af fortyndet Folin-reagens.

Enzymproduktet udviser proteolytisk virkning som følger:

| pH                 | 8,3 | 8,8 | 9,4 | 9,8 | 10,3 | 10,8 | 11,3 | 11,7 | 12,5 |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 5 relativ virkning | 85  | 87  | 91  | 88  | 87   | 94   | 91   | 99   | 100  |

b) Elektroforesemønstre.

10 Enzymproduktets karakter kan yderligere bestemmes ved zymogrammetoden, der er baseret på en kombination af pladeelektroforese i polyacrylamidgel og visuel observering af virkningen. Metoden er blevet beskrevet af Zuidweg et al., i Biotech. og Bioeng. 14 (1972), 685-714, 15 og tillader en direkte sammenligning af præparater. Der er foretaget en sammenligning af det omhandlede enzymprodukt a), en protease opnået fra en Bacillus-stamme deponeret hos the National Collection of Type Cultures i London, som NCTC 4553, jvf. engelsk patentbeskrivelse nr. 1.205.403, (b), et kommercielt tilgængeligt 20 proteolytisk enzym MAXATASE (Gist-Brocades N.V., Delft, Holland) (c), og et kommercielt tilgængeligt enzym ESPERASE (d), jvf. medfølgende tegning Kun hovedkomponenterne er angivet. Det anvendte buffersystem 25 i elektroforeseadskillelsen var system E, der indeholdt Tris (dvs. 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol) og borsyre, og den visuelle observering af virkningen udførtes ved immersionskontaktteknik, således som beskrevet i Zuidweg et al. artiklen.

30 Tegningen viser, at enzymproduktet, som anvendes i vaskemiddelkompositionen ifølge opfindelsen, består af flere forbindelser, hvis sammensætning er forskellig fra sammensætningen af de andre enzympræparater. c) Aminosyresammensætning.

35 Aminosyresammensætning af de to hovedkomponenter A og B (jvf. den medfølgende tegning) bestemtes. Sammensætningen er vist i tabellen sammenlignet med aminosyresammensætningen af adskillige kendte enzymer:

- (1) substilisin Carlsberg, jvf. Delange og Smith, J. Biol. Chem. 243 (1968) 2134; (2) enzymet fra *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*, anvendt som reference-enzym i U.S.A. patentbeskrivelsen nr. 3.622.458; (3) 5 enzymet fra *Bacillus firmus*, jvf. hollandsk patent-ansøgning nr. 72.07050, og (4) enzymet fra B 221, jvf. K. Horikoshi, Agr. Biol. Chem. 35 (1971) 1407.

Bestemmelserne skal anses for at ligge inden for de sædvanlige fejl  $\pm 10\%$  af de angivne værdier.

- 10        Tabellen viser yderligere molekylvægtene af enzymerne, såvel som de isoelektriske punkter.

|    | Amino-<br>syre             | 8      |         |        |        | Enzymproduktet anvendt i midlet<br>ifølge opfindelsen |               |
|----|----------------------------|--------|---------|--------|--------|-------------------------------------------------------|---------------|
|    |                            | (1)    | (2)     | (3)    | (4)    | Forbindelse A                                         | Forbindelse B |
|    | LYS                        | 9      | 6       | 4      | 6      | 6                                                     | 6             |
|    | HIS                        | 5      | 5       | 6      | 8      | 7                                                     | 6             |
| 5  | ARG                        | 4      | 3       | 6      | 8      | 9                                                     | 8             |
|    | ASP                        | 28     | 20      | 23     | 29     | 27                                                    | 28            |
|    | THR                        | 19     | 14      | 14     | 18     | 16                                                    | 16            |
|    | SER                        | 32     | 37      | 22     | 23     | 30                                                    | 30            |
| 10 | GLU                        | 12     | 12      | 14     | 16     | 15                                                    | 15            |
|    | PRO                        | 9      | 10      | 12     | 16     | 12                                                    | 13            |
|    | GLY                        | 36     | 25      | 30     | 39     | 31                                                    | 33            |
|    | ALA                        | 42     | 27      | 32     | 45     | 36                                                    | 36            |
| 15 | CYS                        | 0      | 0       | 0      | 0      | 0                                                     | 0             |
|    | VAL                        | 31     | 20      | 21     | 27     | 22                                                    | 22            |
|    | MET                        | 5      | 3       | 2      | 4      | 3                                                     | 3             |
|    | ILEU                       | 10     | 12      | 7      | 9      | 8                                                     | 9             |
|    | LEU                        | 16     | 12      | 16     | 22     | 18                                                    | 18            |
| 20 | TYR                        | 13     | 9       | 6      | 7      | 7                                                     | 6             |
|    | PHE                        | 4      | 2       | 2      | 2      | 2                                                     | 2             |
|    | TRY                        | 1      | 3       | -      | 5      | 3                                                     | 3             |
| 25 | Mole-<br>kyl-<br>vægt      | 27.300 | 22.700  | 26.000 | 30.000 | 25.500                                                | 25.500        |
|    | Isoelek-<br>trisk<br>punkt | 9,3    | 7,5-8,0 | 11,0   | 9,4    | 10,5                                                  | 10,5          |

30

Substrat-specificitet. Sammenligning med de kendte  
proteolytiske enzymer "Nagarse" og "Maxatase".

|    | Substrat                 | Relativ reaktionshastighed (%)             |           |            |
|----|--------------------------|--------------------------------------------|-----------|------------|
|    |                          | Enzymprodukt<br>anvendt ifølge opfindelsen | "Nagarse" | "Maxatase" |
| 35 | Casein ifølge Hammersten | 100                                        | 100       | 100        |
|    | Æggehvidealbumin         | 10                                         | 10        | 8          |
|    | Gelatine                 | 202                                        | 110       | 149        |
|    | Hæmoglobin               | 179                                        | 132       | 144        |

Enzymkoncentrationen var 4,2 DU/ml. Resultaterne viser en bred substratspecificitet for enzymproduktet anvendt i midlet ifølge opfindelsen og en vis grad af ulighed mellem de tre enzymprodukters specificiteter, 5 særlig med gelatine som substrat.

Temperatures indflydelse på den relative aktivitet af enzymproduktet anvendt i midlet ifølge opfindelsen ved pH 8,5.

|    |                              |    |    |     |    |
|----|------------------------------|----|----|-----|----|
| 10 | Temp. (°C)                   | 40 | 50 | 60  | 70 |
|    | Relativ aktivitet ved pH 8,5 | 41 | 74 | 100 | 9  |

Temperatures indflydelse på den relative aktivitet af enzymproduktet anvendt i midlet ifølge opfindelsen ved

|    |                               |    |    |      |     |      |       |
|----|-------------------------------|----|----|------|-----|------|-------|
| 15 | pH 10,0.                      |    |    |      |     |      |       |
|    | Temp. (°C)                    | 40 | 50 | 52,5 | 55  | 57,5 | 60 70 |
|    | Relativ aktivitet ved pH 10,0 |    |    |      |     |      |       |
|    | i % af aktiviteten ved 55°C   | 42 | 82 | 95   | 100 | 77   | 41 8  |

20 Betydning af pH, temperatur og andre faktorer for deaktivering.

Stabiliteten i opløsning af enzymproduktet anvendt i midlet ifølge opfindelsen overfor temperaturen undersøgtes. På grund af enzymproduktets anvendelse som 25 tilsætning til husholdningsvaskemidler, bestemtes varmemstabiliteten under normale vaskebetingelser. I overensstemmelse hermed udførtes varmemstabilitetsforsøgene i syntetisk postevand (STW) med eller uden tripolyphosphat (TPF, 0,15% vægt/volumen). Enzym- 30 koncentrationen under opvarmningen var 400 DU/mg.

Indflydelse af pH på stabilitet ved 40°C

|    |                           |    |    |     |    |     |    |    |    |    |    |
|----|---------------------------|----|----|-----|----|-----|----|----|----|----|----|
|    | pH under opvarmning       | 2  | 3  | 4   | 5  | 6   | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 |
|    | Restaktivitet (%) ved     |    |    |     |    |     |    |    |    |    |    |
| 35 | Opvarmning i STW med TPF  | 79 | 98 | 90  | 93 | 89  | 91 | 85 | 11 |    |    |
|    | Opvarmning i STW uden TPF | 16 | 81 | 100 | 97 | 100 | 97 | 95 | 98 | 88 | 79 |

I et andet forsøg bestemtes stabiliteten ved pH 8,5 i syntetisk postevand indeholdende tripolyphosphat (0,15% vægt/volumen) ved to temperaturer.

Temperatures indflydelse på stabiliteten ved pH 8,5.

| 5                              | Restaktivitet (%) efter opvarmning |     |     |     |
|--------------------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|
| Varighed af opvarmning (timer) | 0                                  | 0,5 | 1,0 | 2,0 |
| Opvarmningstemperatur 40°C     | 100                                | 95  | 93  | 87  |
| Opvarmningstemperatur 50°C     | 100                                | 82  | 77  | 69  |

#### 10 Hæmning, aktivering og stabilisering.

Der udførtes forsøg med følgende enzym-hæmmere:

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Mercuri- eller parachlormercuri-benzoesyre (PCMB)

Ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA)

#### 15 Monoiodeddikesyre (MIA)

Indflydelse af hæmmere på enzymaktiviteten.

Hæmmer (konc.  $1 \times 10^{-3}$  M) Ingen PMSF PCMB EDTA MIA

Relativ aktivitet 100 5 117 91 106

Inkubationerne udførtes i syntetisk postevand

#### 20 indeholdende tripolyphosphat (0,15% vægt/volumen) ved pH 8,5 i 30 minutter og ved 40°C.

Den ovenfor omtalte *Bacillus nov.spec.* PB 92, ved hjælp af hvilken det i midlet ifølge opfindelsen

#### 25 anvendte enzymprodukt kan fremstilles, beskrives nærmere i det følgende:

Taxonomi.

Til den taxonomiske bestemmelse er anvendt Smith, Gordon og Clark, "Aerobic Sporeforming Bacteria", U.S.

#### 30 Dept. of Agr., Monograph No. 16 (1952). Sporulering af *Bacillus* PB 92 kan fremkaldes ved dyrkning af lyophiliserede kulturer af gamle TSB (Trypton Soja bouillon fra Oxoid) agar kulturer (65 dage) på TSB agar.

Morphologi.

#### 35 (a) Vegetative celler: (mobile) stave, rundede ender, i reglen enkelte, men også i korte kæder af 2-8 stave. Sommetider findes meget lange kæder, der har en længde på 1000 $\mu$ eller mere.

(b) Sporangier: Sommetider lidt svulmede.

(c) Sporer : 0,6-0,8 til 1,0-1,3  $\mu$ ; ellipsoide; tykvæggede; subterminale til paracentrale.

(d) Skyggeformer: Temmelig mange; også i midten af en  
5 kæde af normale celler.

#### Vækstforhold

#### Bemærkninger:

##### Agarkoloni:

|    |                 |                             |
|----|-----------------|-----------------------------|
|    | Form            | Uregelmæssig                |
|    | Overflade       | Ujævn, hindeagtig spredning |
| 10 | Kant            | Udragende dele              |
|    | Væksthøjde      | Flad                        |
|    | Optisk karakter | Uklar                       |

##### Agar-stregkultur:

|    |           |           |
|----|-----------|-----------|
|    | Vækst     | Moderat   |
| 15 | Vækstform | Spredning |
|    | Glans     | Mat       |

##### Nærings-bouillon:

|    |                |               |
|----|----------------|---------------|
|    | Overfladevækst | Hinde         |
|    | Uklarhed       | Forbigående   |
| 20 | Sediment       | Flaget        |
|    | Sedimentmængde | Meget sparsom |

##### Gelatine-stik:

|    |                |                           |
|----|----------------|---------------------------|
|    | Vækst          | Bedst for oven            |
|    | Stiklinie      | Sparsom vækst             |
| 25 | Smeltning      | Positiv, substrat uændret |
|    | Smeltningsgrad | Ringe, de dog nedenfor    |

##### Lakmusmælk:

|    |               |         |
|----|---------------|---------|
|    | Reaktion      | Syrning |
|    | Syre-kasein   | Negativ |
| 30 | Enzym-kasein  | Negativ |
|    | Peptonisering | Positiv |

#### Fysiologiske forhold:

#### Bemærkninger:

|    |                           |                      |
|----|---------------------------|----------------------|
|    | Reduktion af nitrat       | Positiv, se nedenfor |
| 35 | Denitrifikation af nitrat | Negativ              |
|    | Methylrødt                | Negativ              |
|    | Voges-Proskauer           | Positiv              |
|    | Indol                     | Negativ              |

| Fysiologiske forhold: |                               | Bemærkninger:           |     |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|-----|
|                       | Dannelse af hydrogensulfid    | Negativ                 |     |
|                       | Hydrolyse af stivelse         | Positiv, se nedenfor    |     |
|                       | Citratudnyttelse              | Positiv                 |     |
| 5                     | Udnyttelse af uorg. nitrogen: |                         |     |
|                       | Nitrat                        | Negativ                 |     |
|                       | Ammoniumsalt                  | Positiv                 |     |
|                       | Farvedannelse:                |                         |     |
|                       | Agar-bouillon                 | Ingen                   |     |
| 10                    | King A                        | Ingen                   |     |
|                       | Urease                        | Positiv                 |     |
|                       | Oxidase                       | Positiv                 |     |
|                       | Katalase                      | Positiv                 |     |
|                       | Vækstområde                   | Ikke vækst under pH 4,0 |     |
| 15                    | Forhold til fri oxygen        | Aerob                   |     |
|                       | O-F test (Hugh Leifson)       | Oxiderende              |     |
|                       | Fermentering: Dannelse af     |                         |     |
|                       | syre og gas:                  | Syre                    | Gas |
|                       | Monosaccharider:              |                         |     |
| 20                    | L-Arabinose                   | -                       | -   |
|                       | D-Xylose                      | +                       | -   |
|                       | D-Glucose                     | +                       | -   |
|                       | D-Mannose                     | +                       | -   |
|                       | D-Fructose                    | +                       | -   |
| 25                    | D-Galactose                   | +                       | -   |
|                       | L-Rhamnose                    | -                       | -   |
|                       | Disaccharider:                |                         |     |
|                       | Sucrose                       | +                       | -   |
|                       | Maltose                       | +                       | -   |
| 30                    | Lactose                       | -                       | -   |
|                       | Trehalose                     | +                       | -   |
|                       | Polysaccharider:              |                         |     |
|                       | Dextrin                       | +                       | -   |
|                       | Stivelse                      | +                       | -   |
| 35                    | Alkoholer:                    |                         |     |
|                       | D-Sorbitol                    | +                       | -   |
|                       | D-Mannitol                    | +                       | -   |
|                       | Inositol                      | +                       | -   |

| <u>Fysiologiske forhold:</u> |                                                                 | <u>Bemærkninger:</u> |     |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------|-----|
|                              |                                                                 | Syre                 | Gas |
|                              | Glycerol                                                        | +                    | -   |
|                              | Adonitol                                                        | Ikke udnyttet        |     |
| 5                            | Dulcitol                                                        | Ikke udnyttet        |     |
|                              | Glucosid:                                                       |                      |     |
|                              | Salicin                                                         | Ikke udnyttet        |     |
|                              | Andre forhold:                                                  |                      |     |
|                              | Lysin-decarboxylering                                           | Negativ              |     |
| 10                           | Cytochrom                                                       | Positiv              |     |
|                              | Indol-phenylpyrodruesyre                                        | Negativ              |     |
|                              | Natriumchlorid-tolerance                                        | 7%                   |     |
|                              | Yderligere kan følgende forhold nævnes:                         |                      |     |
|                              | Maksimum væksttemperatur: 50°C                                  |                      |     |
| 15                           | Gram-positiv; obligat aerob.                                    |                      |     |
|                              | Vækst på næringsagar pH 7,2; starter sommetider noget lang-     |                      |     |
|                              | sommere end ved pH 9,4. Kanterne af kolonierne ved pH 7,2 fuld- |                      |     |
|                              | stændige, men ved pH 9,4 krøllede til filamentøse.              |                      |     |
|                              | Ingen dannelse af pigment på tyrosinagar ved pH 9,5             |                      |     |
| 20                           | Svag stivelseshydrolyse på kartoffelstivelse/-                  |                      |     |
|                              | næringsagar ved pH 9,5.                                         |                      |     |
|                              | Stærk smeltning af gelatine på gelatine/næringsagar             |                      |     |
|                              | ved pH 9,5.                                                     |                      |     |
|                              | Klar kaseinfordøjelse på mælkeagar ved pH 8,4.                  |                      |     |
| 25                           | Ingen eller ringe vækst på glucose- eller mannitol-             |                      |     |
|                              | agar med nitrat som eneste nitrogenkilde.                       |                      |     |
|                              | Nitratreduktion positiv i nitrat/næringsbouillon                |                      |     |
|                              | pH 9,5.                                                         |                      |     |
|                              | Nærmest beslægtede kendte mikroorganisme af Bacillus-           |                      |     |
| 30                           | slægten anses at være en Bacillus cereus-stamme, be-            |                      |     |
|                              | tegnet som Bacillus cereus No. 8-1 (beskrevet bl.a. i den       |                      |     |
|                              | offentliggjorte japanske patentansøgning nr. 13708/78).         |                      |     |
|                              | Denne sidstnævnte mikroorganisme er af en uafhængig             |                      |     |
|                              | japansk institution blevet sammenlignet med Bacillus            |                      |     |
| 35                           | nov.spec. PB 92 ved undersøgelse af de forskellige,             |                      |     |
|                              | ovenfor omtalte forhold. Forskellene mellem de to               |                      |     |
|                              | organismer er blevet opsummeret som følger:                     |                      |     |

| Egenskaber                 | Bacillus cereus<br>No. 8-1       | PB 92               |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Morfologi:                 |                                  |                     |
| Polymorfi                  | -                                | +                   |
| 5 Motilitet                | +                                | -                   |
| Vækst på substrat:         |                                  |                     |
| pH                         | Næsten ingen vækst<br>ved pH 7,0 | Vækst ved<br>pH 7,2 |
| Overfladevækst             |                                  |                     |
| 10 på nærings-bouillon     | Ingen hinde                      | Hinde               |
| Biologiske egenskaber:     |                                  |                     |
| Reduktion af               |                                  |                     |
| Nitrat                     | -                                | +                   |
| V P test                   | -                                | +                   |
| 15 Citratudnyttelse        | +                                | +                   |
| Udnyttelse af ammoniumsalt | -                                | +                   |
| Urease                     | -                                | +                   |
| Vækst-temperatur           | mindre end 45°C                  | Vækst ved<br>50°C   |
| 20 Fermentering:           |                                  |                     |
| Fructose                   | -                                | +                   |
| Galactose                  | -                                | +                   |
| Sorbitol                   | -                                | +                   |
| Mannitol                   | -                                | +                   |
| 25 Natriumchloridtolerance | 12%                              | 7%                  |

Bacillus nov.spec. PB 92 må formentlig anses som repræsenterende en ny art, selv om dette endnu ikke har kunnet fastslås helt sikkert.

### 30 Isolering:

Mikroorganismene, der producerer enzymproduktet anvendt i midlet ifølge opfindelsen isoleredes fra en jordprøve fra Zambia ved hjælp af en særlig isolations-teknik ved et pH inden for området 8,0 til 9,5.

### 35 Forøgning.

For at opnå høje udbytter af enzymproduktet ved dyrkning af Bacillus PB 92 er substrater, der inde-

holder let assimilerbart carbon og energikilder  
nødvendige, såsom glucose, sucrose, dextriner og stivelse  
og en nitrogenkilde af organisk oprindelse såsom casein,  
gær og sojamel. Yderligere tilsættes fortrinsvis visse  
5 mængder af calcium-og magniumsalte og adskillige spor-  
elementer.

En god gennemluftning er nødvendig under for-  
gæringen. Substrates pH holdes passende mellem 6,5 og  
10, fortrinsvis mellem 7 og 9. Forgæringstemperaturen  
10 er passende 37°C.

Når der iagttages alle sikkerhedsforanstaltninger,  
kan man opnå meget høje udbytter (proteaseaktivitet pr.  
g af omsat glucose). Udbytte er tilstrækkeligt højt til  
en økonomisk produktion af enzymproduktet.

15 Udvinning af enzymproduktet.

Enzymproduktet udvindes af forgæringsbouillon  
på sædvanlig måde. Bouillonens filtreres for at fjerne  
mikroorganismerne og uopløseligt materiale. Til tørre  
vaskemiddelkompositioner udfældes enzymproduktet sæd-  
20 vanligvis ved at tilsætte vandblandbart organisk op-  
løsningsmiddel eller uorganiske salte såsom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
eller  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  til filtratet. For at opnå en økonomisk  
produktion reduceres rumfanget af filtratet ved ind-  
dampning først, inden man tilsætter opløsningsmidlerne  
25 eller saltene. Til flydende vaskemiddelkompositioner kan  
anvendes den filtrerede bouillon eller det genop-  
løste enzymprodukt.

Efter udfældning fraskilles enzymproduktet ved  
filtrering eller centrifugering, og den resulterende  
30 kage tørres.

Anvendelse i vaskemiddelkompositioner:

Enzymproduktet kan indføres i vaskemiddelkompo-  
sitioner på sædvanlig måde. Mængden af enzymproduktet,  
der skal indføres, svarer sædvanligvis til, at man i  
35 den endelige vaskemiddelkomposition får en proteolytisk  
aktivitet på ca. 100-5000 DU/g, fortrinsvis 500-1000  
DU/g. Bestemmelsen af den proteolytiske aktivitet er  
beskrevet i engelsk patentbeskrivelse nr. 1.353.317.

Vaskemiddelkompositioner ifølge opfindelsen indeholdende det omhandlede enzymprodukt indeholder normalt yderligere mindst ét tennid. Tensiderne, der er nyttige i vaskemiddelkompositionerne, er de i  
5 vaskemiddelkompositioner med enzymatisk virkning sædvanligt anvendte. Sædvanligvis kan ikke-ioniske eller anioniske overfladeaktive forbindelser anvendes, såsom vandopløselige sæber, anioniske, ikke-anioniske, amfolytiske og zwitterioniske tensider. Et eksempel  
10 på en almindeligvis anvendt tensid er dodecylbenzen-sulfonat. Sædvanligvis anvendes tensiderne , der kan anvendes alene eller i blandinger, i en mængde af ca. 4-20% af vaskemiddelkompositionen.

Vaskemiddelkompositionerne kan indeholde andre  
15 forbindelser, der sædvanligvis anvendes i andre vaskemiddelkompositioner med proteolytisk aktivitet. De indeholder sædvanligvis komplekse phosphater, f.eks. et alkalimetalttripolyphosphat eller et alkalimetalt-pyrophosphat, fortrinsvis i mængder på ca. 40-50 vægt%  
20 af vaskemiddelkompositionen. Yderligere eller alternativt kan de indeholde sådanne forbindelser, som alkalimetalt-nitrilotriacetat og alkalimetaltcitrat. Deres virkning i vaskemiddelkompositionerne er kompleks, men deres mest vigtige virkning er, at de virker som vandblødgørings-  
25 midler. Andre forbindelser er f.eks. et alkalimetalt-silikat, sædvanligvis i mængder på 1-10 vægt%, svagt alkaliske forbindelser, såsom alkalimetaltbicarbonat, sædvanligvis i mængder indtil 20 vægt%, fyldstoffer, f.eks. et alkalimetalt-sulfat, og andre forbindelser,  
30 såsom carboxymethylcellulose, parfumer og optiske blegemidler. Andre forbindelser, der sædvanligvis er inkorporeret, er alkalimetaltperborater, specielt natriumperborat, og i forbindelse med perboraterne bør det bemærkes, at enzymproduktet har en uventet høj  
35 stabilitet i nærværelse af disse.

Vaskemiddelkompositionerne kan fremstilles på sædvanlig måde, f.eks. ved at sammenblande komponenterne eller ved først at lave en pre-mix. Denne blandes

herefter med de andre forbindelser. Fortrinsvis blandes enzymproduktet med en eller flere af de andre forbindelser, f.eks. med fyldstoffet, for at fremstille et koncentrat af en forud bestemt enzymatisk aktivitet, 5 hvilket koncentrat kan blandes med de andre ønskede komponenter.

Fremstillingen af det omhandlede enzymprodukt og anvendelsen af dette i vaskemiddelkompositionen ifølge opfindelsen forklares nærmere i efterfølgende 10 eksempler.

#### Eksempel 1

Fremstilling af enzymprodukt.

Forgæring af *Bacillus* PB 92.

15 Det følgende substrat anvendtes:

|    |                            |            |
|----|----------------------------|------------|
|    | Gær (beregnet som tørstof) | 22 g/liter |
|    | $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$     | 5 -        |
|    | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$       | 0,05 -     |
|    | $CaCl_2$                   | 0,05 -     |
| 20 | $FeSO_4 \cdot 7H_2O$       | 0,005 -    |
|    | $MnSO_4 \cdot 4H_2O$       | 0,005 -    |

Substratkomponenterne opløstes i 90% af det endelige volumen, og steriliseredes herefter ved pH 7,0 25 ved en temperatur på 120°C i 1 time.

Man opnåede podningskulturen ved fra en skrå-agar med *Bacillus* PB 92 at pøde 100 ml trypticasesoja-bouillon (Oxoid), til hvilken der efter sterilisering ved 120°C i 20 minutter var sat 4 ml 1 M natrium- 30 carbonat. Podningskulturen dyrkedes ved 30°C i 24 timer på et GALLENKAMP rysteapparat.

Substratet dyrkedes ved 37°C og pH 8,0 med et rumfang af podningskulturen pr. 100 rumfang substrat. Hovedforgæringen udførtes ved 37°C i en omrøringsforgæ- 35 ringsbeholder udstyret med en pH-kontrolanordning, en temperaturkontrolanordning, en antiskumningsanordning og en anordning til kontinuerlig måling af den opløste oxygenkoncentration og oxygenoptagelseshastighed.

## 18

17 timer efter podningen tilsættes en 30%'s glucose-opløsning steriliseret ved  $120^{\circ}\text{C}$  i 1 time, til opnåelse af en slutkoncentration af 30 g glucose per liter substrat.

- 5 De opnåede resultater tydede på et udbytte af det proteolytiske enzymprodukt på ca.  $8 \times 10^5$  DU/g glucose forgæret.

I hollandsk patentansøgning 72.07050, eksempel 1, beskrives et forgæringsforsøg, i hvilket det endelige  
10 udbytte på  $11 \times 10^6$  DU/liter bouillon opnås (50 Anson-enheder svarer omtrent til  $11 \times 10^6$  DU). Mængden af anvendt kulhydrat er ækvivalent med ca. 75 g glucose pr. liter bouillon. Udbyttet af protease pr. g omsat glucose i eksemplet i ansøgning 72.07050 andrager  
15  $1,5 \times 10^5$  DU. Udbyttet af det i vaskemiddelkompositionen ifølge opfindelsen anvendte enzymprodukt er således 5 gange større.

## Eksempel 2

- 20 Vaskeevne.

Vaskeprøver udførtes på følgende måde:

- 1) Forsøgsstykker af klæde: EMPA-116 (plettet med blod, mælk og tush) opnået fra Eidgenössische Material Prüfungs- und Versuchsanstalt für Industrie, Bauwesen  
25 und Gewerbe i Skt. Gallen, Svejts. Forsøgsstykkerne opbevares i mørke og lufttæt.

Til vaskeforsøg skæres de nødvendige stykker på 5 x 5 cm ud fra en visuelt homogen del af klædet.

- 2) Vaskerisæbevand: 4 g/l af et perboratholdigt  
30 kommercielt tilgængeligt vaskemiddel uden enzym pr. liter "syntetisk postevand" (STW), der havde en hårdhed på  $15^{\circ}\text{dH}$ , fremstillet på følgende måde:

10 ml 2%  $\text{CaCl}_2$  (pro analysi) opløsning i destilleret vand sættes til 10 ml af en opløsning af 0,656%  
35  $\text{MgCl}_2$  i destilleret vand i en 1000 ml målekolbe. Indholdet blandes grundigt. Herefter tilsættes 10 ml af en 2,1%'s  $\text{NaHCO}_3$  (pro analysi) opløsning og indholdet blandes igen, og der fyldes op med destilleret

vand, således at der bliver 1000 ml.

3) Prøve: Til hver af et tilstrækkeligt antal 300 ml Erlenmeyer-kolber sættes 250 ml af vaskerisæbevandet. Der tilsættes mængder af enzymproduktet svarende til 5 0, 250, 500 og 1000 DU/g af vaskemiddelkompositionen (dobbeltforsøg). Erlenmeyer-kolberne anbringes i en rystetermostat ved 45°C, i hvilken de varmes op under omrystning. Herefter tilsættes et stykke stof til hver af Erlenmeyer-kolberne, og der rystes i nøjagtig 1 time 10 ved 45°C.

Efter vask dekanteres vaskerisæbevandet, og der tilsættes 250 ml STW. Kolberne lukkes med gummipropper, og rystes kraftigt i nøjagtig 1 minut.

Tøjstykkerne lægges i et bager, i hvilket de 15 skylles i langsomt rindende postevand. Efter at det sidste stykke tøj er sat til, fortsættes skylningen i ca. 10 minutter. Tøjstykkerne får lov at tørre i luften i mørke, anbragt i et hvidt rent håndklæde.

Efter tørring bestemmes remissionen i et ZEISS 20 ELREPHO remissionsmeter med filter nr. 1 på begge sider, idet man anvender MgO som reference. Middelværdierne udregnes med reference til et fuldstændig rent stykke tøj, der har en remission på 65,8% over for MgO.

Sammenligning mellem det omhandlede enzym- 25 produkt og "MAXATASE" og "ESPERASE".

Vaskeprøverne udførtes på den ovenfor nævnte måde ved pH 9,7. Resultaterne var følgende:

| DU/g    | % remission           |    |          |    |          |    |
|---------|-----------------------|----|----------|----|----------|----|
|         | enzympr. iflg. eks. 1 |    | MAXATASE |    | ESPERASE |    |
|         |                       | Δ  |          | Δ  |          | Δ  |
| 0       | 20                    | -  | -        | -  | -        | -  |
| 250     | 41                    | 21 | 30       | 10 | 31       | 11 |
| 500     | 46                    | 26 | 33       | 13 | 36       | 16 |
| 25 1000 | 52                    | 32 | 36       | 16 | 39       | 19 |

Således viser tabellen, at under forsøgsbetingelserne har det her omhandlede enzymprodukt en bedre vaskeevne, end de kommercielt tilgængelige "MAXATASE" og "ESPERASE".

## P A T E N T K R A V

1. Vaskemiddelkomposition med proteolytisk  
virkning, k e n d e t e g n e t ved, at den inde-  
holder en virksom mængde af et enzymprodukt, der er  
5 karakteristisk ved,

- a) at det har optimal proteolytisk aktivitet ved en  
pH-værdi over 12, idet aktiviteten måles overfor  
denatureret hæmoglobin i overensstemmelse med Anson-  
metoden,
- 10 b) at det består af mindst to proteolytisk aktive  
komponenter, der viser et karakteristisk zymogram  
ved pladeelektroforese som vist på tegningen,
- c) at de to hovedkomponenter har følgende amino-  
syresammensætning:

15

|    |               | Komponent A | Komponent B |
|----|---------------|-------------|-------------|
|    | Lysin         | 6           | 6           |
|    | Histidin      | 7           | 6           |
| 20 | Arginin       | 9           | 8           |
|    | Asparaginsyre | 27          | 28          |
|    | Threonin      | 16          | 16          |
|    | Serin         | 30          | 30          |
|    | Glutaminsyre  | 15          | 15          |
| 25 | Prolin        | 12          | 13          |
|    | Glycin        | 31          | 33          |
|    | Alanin        | 36          | 36          |
|    | Cystin        | 0           | 0           |
|    | Valin         | 22          | 22          |
| 30 | Methionin     | 3           | 3           |
|    | Isoleucin     | 8           | 9           |
|    | Leucin        | 18          | 18          |
|    | Tyrosin       | 7           | 6           |
|    | Phenylalanin  | 2           | 2           |
| 35 | Tryptophan    | 3           | 3           |

d) at de to hovedkomponenter har følgende fysiske egenskaber:

|                    |        |        |
|--------------------|--------|--------|
| isoelektrisk punkt | 10,5   | 10,5   |
| 5 molekylvægt      | 25.500 | 25.500 |

e) og at der er identisk med det proteolytiske enzymprodukt, der kan isoleres fra et dyrkningssubstrat fremkommet ved dyrkning af *Bacillus nov.spec.* PB 92, hvorefter en kultur er deponeret i Laboratoriet for Mikrobiologi ved Det Tekniske Universitet i Delft, Holland, under nr. OR-60, under aerobe betingelser i et substrat, indeholdende sædvanlige carbon- og energikilder, en nitrogenkilde, calcium- og magnesiumsalte og sporelementer.

2. Vaskemiddelkomposition ifølge krav 1, kendet ved, at den indeholder enzymproduktet sammen med et tensid, et vandblødgøringsmiddel, et alkalimetalsilicat, et alkalimetaltbicarbonat og eventuelt et alkalimetallperborat.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af en vaskemiddelkomposition som angivet i krav 1, kendet ved, at et enzymprodukt som defineret i krav 1, blandes med de i kompositionen indgående vaskemiddelkomponenter.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 6032/70 (patent nr. 136484).

