

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 9/20

(45) 공고일자 1996년04월06일
(11) 공고번호 특1996-0004451

(21) 출원번호	특1987-0700306	(65) 공개번호	특1988-7000067
(22) 출원일자	1987년04월09일	(43) 공개일자	1988년02월15일
(86) 국제출원번호	PCT/NL 86/000023	(87) 국제공개번호	WO 87/00859
(86) 국제출원일자	1986년08월08일	(87) 국제공개일자	1987년02월12일

(30) 우선권주장 85201302.8 1985년08월09일 네덜란드(NL)
(71) 출원인 기스트-브로카데스 나암로제 베노오트하프 한스 워터 라벤
네델란드 델프트 워터링스웨그

(72) 발명자 파로크 파린
네델란드 2394 게테 하르스우우데-리즌디즈크 슈베르트 플라트선 6
요하네스 야코부스 마리아 라보우트
네델란드 2106 에카 헤엠슈테데 알베르딩크 티즈물란 8
게리트 요하네스 베르쇼오트

(74) 대리인 네델란드 2731 에하우 벤트후이젠 로데 크루이스 슈트라아트 5
장용식

심사관 : 김형준 (책자공보 제4402호)

(54) 세척제용 지방분해효소의 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

세척제용 지방분해효소의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 지방물질의 효소학적분해(degradation)를 위한 효소의 제조방법에 관한 것이다. 더 상세히는, 본 발명은 세제첨가제로서 사용하기에 특히 적합하게 하는 세척조건하에 개선된 지방분해 활성을 가진 신규한 지방분해효소의 제조방법에 관한 것이다.

발명은 또한 세척조성물 첨가제의 제조방법 및 이들 세척조성물을 사용하는 세척방법에 관한 것이다.

더 나아가서, 발명은 신규한 지방분해효소로 이루어지는 세척조성물의 제조방법에 관련된다.

본 발명의 효소는 물리화학적 및 효소학적 특성이 서로 다른 것이 발견된 일정한 미생물에 의해서 및 특정한 어떤 세균에서 생성된 다수의 지방분해효소의 적어도 한가지로 이루어진다.

세탁물세척과 관련된 특별한 문제는 지방성질의 더러움의 제거에 관한 것이다. 이 문제는 낮은 세척온도를 향한 경향이 존속하는 한 여전히 더 악화될 것이다.

그때, 지방함유 오물은 고온 및 고알칼리성에서 세척 과정의 결과 유화되고 제거된다.

에너지절약을 위한 현재의 경향에 기인하여, 비교적 낮은 세척온도, 즉 40℃ 부근 또는 그 이하온도의 사용을 향한 강한 경향이 있다. 그러므로, 낮은 세척 온도에서, 효과적이며, 높은 알칼리성 세제 용액에서 안정하며 고체 또는 액체 세제조성물 모두의 보관조건하에 안정한 리파아제에 대한 필요가 있다.

세제조성물에 지방분해효소의 사용은 다년간 공지되어 왔으나(예로써, 영국특허 명세서 제1,442,418호의 1페이지, 36-38째줄에 언급된 문헌 참조), 그들은 세척조건하에 단지 매우 낮은 세척효율만을 나타내고 그들은 본 안정성 요구 조건을 충족하지 못하기 때문에 실제로는 오히려 불만족함을 나타낸다. 포괄적인 리부아티클로는 안드레와(H.Andree et al., J. Appl. Biochem., 2(1980)218-229)의 "세제성분으로서의 리파아제"를 들 수 있다.

지방분해세제 첨가제는 또한 예를들면, 영국특허명세서 제1,293,613호와 캐나다 특허 제835,343호에 공지되어 있다.

미국특허 제3,950,277호와 영국특허명세서 제1,442,418호는 각각 활성화제와 칼슘 및/또는 마그네슘 이온과 결합된 리파아제효소를 명시하고 있는데, 이것은 더럽혀진 섬유를 사전 담금하고 트리글리세리드 더럽 및 오물을 폴리에스테르 또는 폴리에스테르/목면섬유혼합물로부터 제거하는데 각각 이용된다.

(동물 및 식물유도된 리파아제와 달리)여기서 사용하기 위한 적합한 미생물 리파아제는 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 뉴모코커스(*Pneumococcus*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 그리고 스태필로코커스독신(*Staphylococcus toxins*), 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 미코토룰라 리폴리티카(*Mycotorula lipolytica*), 및 클레토니아(*Sclerotinia*)로부터 유도된 것들임을 말한다.

영국특허 명세서 제1,372,034호는 슈도모나스 스투제리(*Pseudomonas stutzeri*)주 ATCC 19154에 의해 생성된 세균성 리파아제로 이루어지는 세제조성물을 명시하고 있다. 더 나아가서, 바람직한 지방분해효소는 6과 10 사이의 pH 최적치를 가져야 하고 바람직하게는 7과 9사이의 상기 범위에서 활성이어야 함을 권장한다. 1970년 무렵, 이 추정된 슈도모나스 스투제리 주는 AT00 카탈로그로부터 예로 나타난 바와 같이 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로서 재분류되었다.

유럽특허출원 EP-A-0130064는 종래의 리파아제보다 추정된 더 높은 지방분해 세척효율을 갖는 후사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로부터 분리된 리파아제로 이루어지는 효소학적 세척첨가제를 명시하고 있다.

광범위한 연구 및 실험결과, 놀랍게도 리파아제 제제는 적합하게 선택된 미생물의 배양에 의해 얻어질 수 있는데 리파아제는 현대 세척조건하에 리파아제 활성을 나타낼 수 있으며, 즉 그들은 높은 세척농도, 높은 pH 및 낮은 세척 온도에서 안정하고 효과적임을 발견하였다.

따라서, 발명은 슈도모나스 슈도알칼리젠스(*Pseudomonas Pseudoalcaligenes*), 슈도모나스 스투제리(*Pseudomonas stutzeri*) 및 아시네토박테르 칼코아세티커스(*Acinetobacter calcoaceticus*)와 종에 속하는 일정한 균주의 배양에 의해 얻어질 수 있는 신규한 리파아제 제제를 제공한다. 상기 리파아제는 약 8과 10.5 사이의 pH 최적치를 지니며, 60°C 또는 이하, 바람직하게는 30-40°C의 온도에서 및 약 7과 11사이, 바람직하게는 약 9와 10.5 사이의 pH에서 세척조건하에 약 10g/l까지의 농도에서 제제를 함유하는 수용액에서 효과적인 리파아제 활성을 나타낸다. pH 최적치는 TLU 측정의 조건하에 pH-고정하에 구하는데, 이것은 이후에 25페이지에 기재한다.

발명의 바람직한 구체예에 따라, 리파아제 제제는 내부 번호 Sp 9, IN 11-5, Gr VI-15 및 M-1을 가진 균주로 구성되는 균으로부터 선택된 신규한 슈도모나스 슈도알칼리젠스 분리물을 통상의 배양조건하에서 배양함으로써 얻을 수 있는데, 이들 균주는 네델란드 바아톤(Baarn)의 쉐드라알 부레아우브오트 쉐멜쿨투레스(Centraal Bureau v oor Schimmelcultures : CBS)에 기탁번호 CBS 467.85(7181), CBS 468.85 (7182), CBS 471.85(7185) 및 GBS 473.85(7187) 하에 1985년 8월 8일에 기탁되었다(이들 균주는 또한 한국과학기술원(KAIST)에 기탁번호 KCTC 8225P, KCTC 8226P, KCTC8227P, 및 KCTC 8228P하에 1987년 3월13일에 기탁되었다). 이들 분리물은 표 1에 나열된 표현형적 특징에 의해 확인된다.

발명의 또다른 바람직한 구체예에 따라, 번호 ATCC 29625하에 아메리칸타임 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)에 기탁된 슈도모나스 슈도알칼리젠스 아종(subspecies) 시트룰리(*citrullii*)의 타입균주를 통상의 배양조건하에 배양함으로써 리파아제 제제가 얻어질 수 있다.

균주 DSM 50188(ATCC 17440, 타입균주와 같음)과 DSM 50189로 예시된 슈도모나스 슈도알칼리젠스 종은 리파아제를 생성하지 않음은 본분야 숙련자에게 공지되어 있다. 그러나, 상기 종은 오히려 불균일함이나 또한 공지되어 있다. 이것은 샤아드 등(N. W. Schaad et al., Int. J. Syst. Microbiol., 28(1978)117-125)에 의해 발견되고 슈도모나스 슈도알칼리젠스 아종 시트룰리로 명명되고 고토(M. Goto, Int. J. Syst. Microbiol., 33(1983) 539-545)에 의해 슈도모나스 슈도알칼리젠스 아종 콘자시(*Konjaci*)로 명명된 새로운 식물병원균의 확인에 의해 명백해진다.

두아종 시트룰리와 콘자시의 표현형적 특징이 서로 다소 다르고 상기한 종의 타입균주와 다를지라도 본분야 숙련자에 의해 이들 아종은 슈도모나스 슈도알칼리젠스에 속하는 것으로 생각된다(예들면, N. J. Palleroni, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1 ed. N. R. Krieg, Williams and Wilkins, Baltimore/London 1984 p. 173-174 참조).

그들의 존재는 슈도모나스 슈도알칼리젠스 종의 표현형적 특징에서 발견된 천연변이를 나타낸다. 슈도모나스 슈도알칼리젠스 종의 새로운 아종 시트룰리 및 콘자시에 의한 리파아제의 생성시, 다른 특성들 가운데 표현형적 특징의 변이가 발견된다.

또한 새로운 분리물은 슈도모나스 슈도알칼리젠스의 이제까지 개발된 아종의 기술된 특징과 다소 다르나 그들은 여섯든 이 종에 속함이 숙련자에 의해 인정될 것이다.

상기한 슈도모나스 슈도알칼리젠스의 4가지 선택된 주의 각각에 의해 생성된 리파아제는 세척조건하에 놀랍게도 양호한 안정성 및 효과를 나타낸다. 상기한 슈도모나스 슈도알칼리젠스 아종 시트룰리의 타입 균주에 의해 생성된 리파아제에 같은 것을 적용하는데, 이들의 유용한 특성은 샤아드 등의 문헌으로부터 결과유도될 수 없다.

발명의 여전히 또다른 바람직한 구체예에 따라, 통상의 배양조건하에 내부번호 Thai IV 17-1을 지니는 신규한 슈도모나스 스투제리 주를 배양함으로써 리파아제 제제가 제조될 수 있는데, 이 균주는 기탁번호 CBS 461.85(7175)하에 1985년 8월 8일 CBS에 기탁되었다(이 균주는 또한 1987년 3월13일에 한국과학기술원에 기탁번호 KCTC 8224P 하에 기탁되었다). 균주는 표 2에 나열된 표현형적 특징에 의해 확인된다. 이 슈도모나스 스투제리주는 35°C와 pH 9.0에서 10g 세제/l까지를 포함하는 세척용액에서 안정한 리파아제를 생성할 수 있다.

상기한 바와같이, 슈도모나스 스투제리 주, ATCC 19154는 세제에 사용될 수 있는 안정한 리파아제를 생성할 수 있음은 공지되었다(미국특허 제3,511,753호 참조). 그러나, 이 기탁된 주는 슈도모나스 이어로지노사로서 재분류되었다(예를들면 ATCC Catalogue of Bacteria, Phages and rDNA Vectors, 16TH ed., 1985, p. 134, no.19154 참조). 따라서 진정한 슈도모나스 스투제리주가 본 발명에서 정의한 바와 같은 안정한 리파아제를 생성할 수 있음은 숙련자가 확실히 예상 또는 기대할 수 없다. 슈도모나스 스투제리는 몇가지 균주를 포함하는 오히려 불균일균주로서 오랫동안 공지되어 왔고 그의 효소생성가능성은 매우 어려웠다. 더우기, 현대 세척조성물에서 이러한 리파아제를 사용하는 가능성에 관하여, 더 구체적으로는 지시된 세척조건하의 그의 안정성이 그렇게 양호할 것에 대한 아무 암시가 없었다.

발명의 여전히 또다른 바람직한 구체예에 따라, 리파아제 제제는 내부번호 Gr V-39를 갖는 아시네토 박테리 칼코 아세티커스의 신규한 분리균주를 통상의 배양조건하에 배양함으로써 리파아제 제제가 얻어질 수 있는데, 이 균주는 기탁 번호 CBS 460.85(7174)하에 1985년 8월 8일에 CBS에 기탁되었다(이 균주는 또한 기탁번호 KCTC 8229P하에 1987년 3월 13일에 KAIST에 기탁되었다). 이 균주는 표 2에 나열된 표현형적 특징에 의해 확인된다. 기탁된 주로부터 얻은 리파아제 제제는 안정하고 40-50°C에서 및 pH 10.3까지의 10g세제/l까지의 세척용액에서 효과적이었다.

본 발명의 바람직한 리파아제 제제는 2g/l의 최저 세제농도에서 분말세제에 대해 이후에 실시예 9에 기술된 조건하에 회수된 지방 적어도 약 10% 및 바람직하게는 적어도 약 20%의 가수분해를 일으키는 것들이다.

[표 1]

슈도모나스 슈도알칼리젠스 주 Sp 9, IN II-5, Gr VI-15 및 M-1의 특성

특성	균주	Sp9	IN II-5	Gr VI-15	M-1
색의 형태 및 크기		간상체	간상체	간상체	간상체
다형성		없음	없음	없음	없음
운동성		운동성	운동성	운동성	운동성
포자의 형성		없음	없음	없음	없음
그늘연색		-	-	-	-
산화에 반응		+	+	+	+
활기성 맥스트로오스		-	-	-	-
효기성	탄스트로오스	-	-	-	-
	알보오스	-	-	-	-
	수크로오스	-	-	-	-
	D-크실로오스	-	-	-	-
말기인 디히드로라세		+	+	-	+
리신 디카복실라세		-	-	-	-
오도닌 디카복실라세		-	-	-	-
우레아제		-	-	-	-
젤라틴 가수분해		-	-	-	-
카탈라제		+	+	+	+
에타-일락포시다제 (ONPG-음)		-	-	-	-
인용형성		-	-	-	-
경산염의 환원		+	+	+	+
이질산염으로 환원된 질산염 (N ₂ 기체발생)		-	-	-	-
전분가수분해		-	-	-	-
메틸알라닌 탈아민화		-	-	-	(+)
시프로산염 이용		+	+	+	+
성장조건	1% 시프로미이드	+	-	n.t.	n.t.
	5.5% NaCl McConkey	-	n.t.	n.t.	n.t.
성장속도	4°C	-	-	-	-
	42°C	+	+	+	+
용해수소생성		-	-	n.t.	n.t.
신초에 대한 작용		효기성	효기성	효기성	효기성
열안정성		없음	없음	없음	없음
안료형성	인-A에지	-	-	-	-
	인-B에지	-	-	-	-
분리물의 광균현		토양 (스페린)	토양 (인디아)	토양 (그위이스)	토양 (탈베이지어)

n.t. = 시험불응 (+) 약화거나 또는 지연됨

[표 2]

슈도모나스 스투제리 주 thai IV17-1과 아세토박테르 칼코아세티커스 주 Gr V-39

특성		주주	Thai IV17-1	Gr V-39
셀의 형태 및 크기			간상체	간상체, 그러나 정지상에서 구상
다형성			없음	있음
운동성			운동성	비운동성
포자의 형성			없음	없음
그램염색			-	-
산화에 반응			+	-
혐기성 페스트로오스			-	+
호기성	메스트로오스		(+)	+
	말포오스		-	-
	수크로오스		-	-
	D-크실로오스		n.t.	+
알기닌 디히드로라제			-	-
리신 디카복실라제			-	-
오르니틴 디카복실라제			-	-
우레아제			-	-
겔라틴 가수분해			-	-
카탈라제			+	+
페타-갈락토시다제 (ONPG-양)			-	-
인돌형성			-	-
결산염의 환원			+	-
아질산염으로 환원된 결산염 (N ₂ 기체 형성)			+	-
전분 가수분해			+	-
페닐알라닌 탈아미라제			-	-
시트로실염 이용			+	+
성장조건	1% 시트르이미드		+	n.t.
	6.5% NaCl McConkey		(+)	n.t.
성장조건	4°C		-	-
	42°C		+	+
황화수소 생성			-	n.t.
산소에 대한 작용			호기성	호기성
영양요구성			없음	영양분 요함
인포형성	장-A제		-	n.t.
	장-B제		-	n.t.
분리물의 동양성			동양 (하이델)	동양 (크라이스)

n.t.=시험없음 (+)양하거나 또는 저면됨

발명의 또다른 관점에 따라 세제와, 임의적으로 세제조성물에 통상 사용되는 다른 성분과 함께 발명에 따르는 리파아제를 함유하는 세척조성물을 제공한다.

발명세척조성물의 성분은 필수적인 리파아제 이외에 다음중 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

1. 효소학적 세척조성물에 통상 사용되는 계면활성제, 일반적으로, 천연적으로 또는 합성 표면활성 화합물, 예를들면 수용성비누, 양이온성, 음이온성, 비이온성, 양쪽성 또는 쌍성이온 계면활성제를 사용할 수 있다.

이 형태의 통상 사용된 계면활성제의 예는 도데실 벤젠 술포네이트이다. 일반적으로, 단독으로 또는 혼합물로 사용될 수 있는 계면활성제는 세척조성물의 약 4 내지 50% w/w의 양으로 존재한다.

2. 바람직하게는 세척조성물의 40중량%까지의 양으로 인산염 착물, 예를들면 알칼리금속 트리폴리포스페이트 또는 알칼리금속 파이로포스페이트 또는 제올라이트와 같은 물 연화제, 더 나아가서 또는 교대로 세척조성물에서 착물작용을 나타내는 알칼리금속 시아노-트리아세테이트 또는 알칼리금속 시트레이트와 같은 화합물들이 포함될 수 있다.

3. 보통 20중량%까지의 알칼리금속 중탄산염과 같은 알칼리금속 규산염 또는 약 알칼리성화합물,

4. 알칼리금속 황산염과 같은 충전제,

5. 카르복시 메틸셀룰로오스, 향료, 광학광택제, 완충화합물, 폴리알킬렌 글리콜 또는 에탄올과 같은 화합물,

6. 프로테아제 및 아밀라제와 같은 다른 형태의 효소.

발명에 따르는 효소학적 세척조성물에서, 리파아제 활성은 바람직하게는 조성물의 1 내지 20,000TU/g 범위인 한편, 단백질 분해효소활성은 바람직하게는 세척조성물의 50-10,000 델프트 유니트/g 범위이다. 1TLU(True Lipase Unit)는 분당 1μmole NaOH의 양과 동등한 적정 가능 지방산으로 서 정의된다(이후의 25페이지 참조).

델프트 단위는 J. Amer. Oil Chem. Soc., 60(1983), 1672에 정의되어 있다. 발명에 따르는 세척 조성물에 함유될 수 있는 또다른 균의 화합물은 알칼리금속 과불소산염, 특히 과불소산나트륨, 과탄산 나트륨 같은 알칼리 금속 과탄산염, 과산 및 그의 염과 같은 표백제와, TAED와 같은 이들 표백제용 활성화제이다. 세척 조성물이 과불소산염, 과탄산염, 활성화제 및 광학 광택제를 한편 포함하고 프로테아제를 다른 한편 포함할 때 본 발명의 리파아제 제제는 이들 성분의 존재하에 계속 그들의 큰 안정성을 나타냈은 크게 놀라운 일이다.

발명의 세척조성물은 통상의 방법으로, 예를들면 성분을 함께 혼합함으로써 또는 초기의 프레믹스의 제제에 의해 제조될 수 있는데, 곧이어 다른 성분과 혼합함으로써 마무리된다. 한 가능한 경로를 따라, 하나 또는 그 이상의 리파아제 제제는 하나 또는 그 이상의 다른 화합물과 혼합하여 소정의 효소학적 활성의 농축물을 만들고, 이 농축물은 다음에 다른 원하는 성분과 혼합될 수 있다.

특히 바람직한 구체예에 따라, 발명의 지방분해효소는 효소학적 세제 첨가제의 형태이다. 이 첨가제

는 또한 하나 또는 그 이상의 다른 효소, 예를들면 프로테아제 및/또는 아밀라제를 포함할 수 있는데, 이것은 현대 세척조성물에 사용될 수 있고 본 분야에 통상 사용되는 하나 또는 그 이상의 다른 성분, 예를들면, 비이온성, 염, 안정화제 및/또는 피복제를 포함할 수 있다. 바람직하게는 효소학적 세제첨가제는 발명 리파아제 이외에 프로테아제 및 임의적으로 알파-아밀라제로 이루어진다. 단백질 분해효소는 발명의 지방분해효소를 깨뜨리지 않음을 발견하였다. 발명에 따르는 효소학적 세제첨가제는 일반적으로 하나 또는 그 이상의 세제 및 본분야 공지의 다른 성분과 혼합되어 세척조성물을 형성한다.

특정 구체예에 따라, 리파아제 활성이 첨가제의 10^2 내지 10^6 TLU/g의 범위인 효소학적 세제첨가제를 사용하는 한편, 임의적으로 존재하는 단백질 분해활성은 5×10^4 내지 10^6 델프트 유닛/g 범위이다.

발명의 효소학적 세제첨가제는 본 분야 특정영역에 일반적으로 공지된 방법에 따라 제조된 예를들어서, 과립 또는 환제(prill)의 형태일 수 있다(예로써 영국특허 제1,324,116 및 1,362,365와 미국특허 3,519,570, 4,106,991 및 4,242,219 참조).

발명의 특정 구체예에서, 효소학적 세제첨가제는 효소안정화제를 가진 액체형태로 제공된다. 이 안정화제는 예를들면 프로필렌 글리콜이다. 이러한 액체 첨가제는 바람직하게는 액체 세제조성물에서 사용된다.

본 발명의 안정하고 효과적인 리파아제 제제는 적당한 조건하에 앞서 정의된 미생물을 배양함으로써 제조될 수 있다. 고수율의 효소를 얻기 위하여, 쉽게 동화탄소를 포함하는 배지 및 카제인과 같은 유기근원의 질소공급원과 같은 에너지공급원이 필요하다. 더 바람직하게는, 칼슘 및 마그네슘염과 미량원소 뿐만 아니라 지방 또는 오일을 배지에 첨가한다.

발명의 바람직한 구체예에 따라, 배양방법은 1 : 1 내지 1 : 25w/v까지의 비율로 물로 사전에 희석시킨 탈지유에서 수행된다. 발효의 동안에 양호한 통기가 필요하다. 배지의 pH는 6과 10 사이에서 바람직하게는 6.5 내지 9 사이에서 알맞게 보존된다.

발명은 또한 발명 세제조성물을 사용하는 세척방법을 제공한다. 이러한 방법은 약 60°C 또는 그 이하, 바람직하게는 30-40°C에서 보통 7과 11 사이의 pH에서 만족스럽게 수행될 수 있다. 세척시간은 일반적으로 10과 60분사이이다. 더 바람직하게는 세척방법에 대해 세척용액의 리터당 0.5 내지 15g, 바람직하게는 1-10g/l 범위의 양으로 본 발명 세제 세제조성물을 함유하는 세척용액이 사용된다.

세척 방법에 있어서 리파아제의 효능

현대 세제조성물은 세척방법에 있어서 최적의 효력을 위해 선택된 성분을 포함한다. 만일 리파아제가 현대 세척법에 사용된다면, 현대 세제조제에서 발견된 통상의 활성이고 효과적인 성분과 적합성이어야 한다. 이 목적으로 세척조건하에 발명 리파아제의 활성 및 효과의 증명을 위해 사용될 수 있는 많은 시험 기준이 선택되었다. 이들 기준은

1. 소듐 트리폴리포스페이트(TPP)와 같은 널리 사용된 세제 빌더의 존재하의 리파아제의 활성.

이 기준은 리파아제가 그들의 활성 및 안정성에 대해 칼슘과 같은 알칼리금속이온에 의존한다는 널리 갖고 있는 믿음때문에 중요하다. 이러한 칼슘의존 리파아제는 따라서 현대 세척과정에 사용하기에 적합하지 않을 것이다.

2. 현대 세척용액에서의 리파아제의 활성.

알칼리성 리파아제의 활성 및 효과를 시험하는데 사용할 수 있는 많은 세제조성물이 있다. 본 발명자는 다른 것들중에서 널리 사용된 현대 세제조제의 전형적인 예로서 분말세제 조성물 및 액체조제를 사용하기로 선택하였다.

이들 전형적인 현대 세제조성물은

- ALL® (분말), 네델란드 유니레버 제품.

본 시험에는 과불소산염, 표백제(TAED) 및 효소없이 ALL과 같은 조제인 ALL-기제(base)(네델란드 블라라트 디겐 유니레버 리서치제품)를 사용하였다. ALL은 등록상표이다.

TIDE® (액체) 프록터 앤드 갬블(Procter & Gamble) 제품이며 미국에서 시중 구입되는 제품.

본 시험을 위하여, 이 조제에 존재하는 효소는 열처리에 의해 불활성화되었다. TIDE는 등록상표이다.

3. 프로테아제를 포함하는 ALL중의 리파아제의 활성. 프로테아제는 현대 세제조성물의 중요한 성분이기 때문에 리파아제의 활성 및 효과는(계면활성제 매트릭스와 함께) 이 세제성분의 존재로 명백해져야 한다.

4. 전형적인(과불소산염과 같은)표백제 및 (TAED와 같은) 표백활성제의 존재하에 리파아제의 활성 표백제(및 낮은 세척온도에서 그들의 활성화제)는 어떤 현대의 세제조성물의 중요한 성분이다.

그들의 존재시 리파아제의 활성 및 효과는 중요한 기준으로 생각된다.

섬유로부터 오일 및 지방의 제거에 대한 발명 리파아제의 기여를 평가하기 위해 세척용액중 발명의 리파아제의 활성의 명료한 측정할 허용하는 적당한 시험시스템이 필요하다.

EMPA 101과 EMPA 102와 같은(스위스, 에스테 갈렌 아이드게뇌시세 마테리알프뤼프스 운드 베르주흐 잔슈탈트에서 시중 구입됨) 통상 사용되는 시험-섬유는 세정력이 안료의 제거로서 측정되는 단점을 갖는다.

EMPA 101 및 102 섬유로부터의 안료의 제거가 지방 또는 지방산의 제거에 직접 관련되는지는 타당한 질문이며 이 이유만으로는 이들 섬유는 리파아제 효능의 평가에 관련되는 것으로 생각되지 않는다.

EPA-0130064에 기술된 바와 같은 다른 시험 시스템은 또한 인위적으로 더럽힌 섬유로부터의 염료의 제거에 의존한다. EMPA 101 및 EMPA 102 시험유의 사용에 한 같은 반론을 여기에 또한 적용한다. 더 우기, 상기한 특허출원의 시험시스템에서 유화된 지방은 알칼리성 리파아제에 대한 기질로서 사용된다. 이 형태의 지방은 현대 세척용액이 달라 붙어야 하는 지방 더럽의 대부분과 일치되지 않는데, 여기서 이러한 더럽은 유화된 형태가 아니고 비유화된 지방 그대로 섬유와 접촉되어 있다.

안드레외(Andree et al., J. Appl. Biochem., 2(1980) 218-229)에 의해 기술된 시험시스템은 섬유에 부착된 방사성 표지된 지방을 사용한다. 세척과정후, 섬유건본상의 방사능을 측정하고 지방분해 활성에 관련시킨다. 그러나 이 시스템에서, 지방으로 인한 방사능과 지방산으로 인한 방사능간의 구별이 가능하지 않고 따라서, 이 시험시스템은 세척과정에서 알칼리성 리파아제의 성능의 신뢰할만한 측정이 아니다.

본 발명의 목적을 위해 이후부터 SLM-시험이라 부르는 새로운 시험을 개발하였는데, 이것이 세척과정에서의 알칼리성 리파아제 및 그들의 활성과 효과의 평가에 사용된다. SLM-시험은 하시모도 외(T.앤드 갠블로부터 시중 구입된다. ALL 및 TIDE는 등록상표이다.

실험을 35, 40 또는 50°C에서 pH 9.0 또는 10.3에서 수행하였다. 샘플을 0, 15 및 30분(때때로 90분까지)에서 혼합물로부터 취하고 기술된 방법중 하나로 잔유 리파아제 활성을 구하였다. 사용된 리파아제는 슈도모나스 슈도알칼리젠스 주 Sp 9(CBS 467.85, KCTC 8225P), IN 11-5(CBS 468.85, KCTC 8226P), Gr VI-15(CBS 471.85, KCTC 8227P) 및 M-1(CBS 473.85, KCTC 8228P), 슈도모나스 스투제리 주 Thai IV 17-1(CBS 461.85, KCTC 8224P) 및 아세토 박테르 칼코아세티커스 주 Gr V-39(CBS 460.85, KCTC 8229P)이었다.

결과를 실시예 4-8에 나타내었다.

세척조건하의 리파아제 효능의 결정을 위한 측정

(SLM-시험)

다음은 SLM-시험이 어떻게 바람직하게 수행되는지의 전형적인 실시예이다.

EMPA 211 목면견본을 섬유로 사용하고 트리올레핀 또는 정제된 올리브유(둘다 시그마(미국)의 제품)를 기질로서 사용한다. 트리올레핀의 가수분해는 섬유의 추출후 크로마토그래피법에 의해 할 수 있다.

SLM-시험의 목적으로 바람직하게 사용된 세척방법은 다음과 같다.

아세톤(25%)에 용해된 5mg 올리브 오일을 포함하는 20 μ l의 부피를 목면견본(3×3cm)에 얼룩지게 한다. 견본을 실온에서 공기 건조시킨다. STM(표준수도물 : 증류수 리터당 0.433g CaCl₂, 0.140g MgCl₂ · 6aq 및 0.210g NaHCO₃) 또는 STW에 용해된 세제를 젖빛 마개를 가진 삼각플라스크(25ml)에 넣고 40°C에서 흔들리는 수욕에 보존한다. 세척방법은 리파아제(20TLU, 이후 참조)를 첨가함으로써 시작하고 그 직후 더럽혀진 견본을 삼각플라스크에 넣고 40°C에서 흔들리는 수욕에 보존한다. 세척방법은 리파아제(20TLU, 이후 참조)를 첨가함으로써 시작하고 그 직후 더럽혀진 견본을 삼각플라스크에 넣고 40°C에서 40분간 흔들다. 바탕실험에는 리파아제를 첨가하지 않는다.

세척후, 견본을 STW로 행구고 이어서 실온에서 건조시켰다. 건조된 견본을 기질과 생성물의 크로마토그래피 분리에 사용된 용리액과 같은 조성을 갖는 용매 5ml를 포함하는 유리관에서 회전에 의해 추출한다.

추출용액에서 잔유 트리글리세리드 및 형성된 유리지방산을 HPLC에 의해 구한다.

장치 및 조건 :

펌프 : 모델 2150(LKB)

검출 : 굴절을 모니터(Jobin Jvon)

주입시스템 : Wisp(MILLIPORE) : 10 μ l

적분기 : SP 4270(스펙트럼 물리학)

컬럼 : CP 마이크로스퍼-Si(CHROMPACK), 100×4.6mm

용리액 : n-헥산/이소프로필알코올/포름산

975 : 25 : 2.5(v/v), 1ml/분

온도 : 주위온도

이들 조건하에 트리올레핀 및 올레산의 지연시간은 각각 1.2 및 1.6분이다. 피이크 면적 또는 피이크 높이를 측정한다. 그들은 견본으로부터 추출후 트리글리세리드와 지방산의 회수율의 측정이다. 미세척 견본으로부터 추출후 트리글리세리드의 회수율은 100%로 취해진다.

상기한 조건하에 올리브유와 올레산간의 굴절을 반응의 비율은 피이크면적을 기준으로 0.85이고 피이크 높이를 기준으로 1.1임을 발견하였다.

[실시예 1]

균주 Sp 9의 리파아제 발효의 동결건조된 상징액의 제조

슈도모나스 슈도알칼리렌스 주 Sp 9(CBS 467.85, KCTC 822P)를 100ml 원추형 플라스크의 30ml 살균한 브레인-하아트 주입(BHI) 배지 (Difco)에 접종시켰다. 배지를 300rpm으로 케도셰이커에서 30℃에서 16시간 동안 흔들었다. BHI 성장세포를 살균한 탈지유배지 500ml를 포함하는 2ℓ 원추형 플라스크에 접종시켰다. 탈지유 배지를 다음과 같이 제조하였다.

- 100g 탈지유(Difco);
- 1리터에 첨가된 탈이온수;
- pH는 살균에 앞서 7.0으로 조절한다;
- 살균조건 : 110℃에서 30분간.

접종된 탈지유 셰이크 플라스크를 250-300rpm으로 케도 셰이커에서 48시간 동안 흔들었다. 리파아제 생성을 위한 성장온도는 20℃이었다. 액즙을 8-10℃에서 10,000g에서 소르볼(Sorvall) R GSA 회전기로 원심분리시켰다. 원심분리후 얻은 상징액을 다음에 동결 건조시켜 리파아제 제제를 얻었다.

다른 리파아제 생성주, 예를들면 균주 CBS 460.85, 461.85, 468.85, 471.85 및 473.85(KCTC 8229P, 8224P, 8226P, 8227P 및 8228P), ATCC 29625 및 DSM 2672(EP-A-130064)의 발효를 유사한 방법으로 수행하되 균주 CBS 468.85(KCTC 8226P)에 대해 성장온도는 30℃이었다.

이 실시예에 따라 얻은 리파아제 제제를 실시예 4-8에 기술된 안정성 실험에 사용하였다.

[실시예 2]

균주 Thai IV 17-1의 리파아제 발효의 동결건조된 상징액의 제조

슈도모나스 스투제리 주 Thai IV 17-1(CBS 461.85, KCTC 8224P)를 100ml 원뿔형 플라스크이 30ml 살균한 BHI 배지에 접종시켰다. 배지를 300rpm에서 케도 셰이커에서 30℃에서 16시간동안 흔들었다. BHI 성장세포를 살균한 GSM 배지 500ml를 포함하는 2ℓ 원뿔형 플라스크에 접종시켰다. GSM 배지는 다음과 같이 제조하였다 :

- 100g 탈지유(디프코 또는 옥소이드);
- 1ℓ 에 첨가된 탈이온수;
- 4N NaOH의 첨가에 의해 pH를 7.8로 조절하였다;
- 교반하면서 온도를 40℃로 가져왔다;
- 다음에 MAXARTASER(기스트-브로케이드) 용액을 첨가하였다.
- 온도 및 pH를 1시간동안 조절하였다.

다음에 pH를 7로 가져왔다.

110℃에서 30분간 살균을 수행하였다.

MAXATASE 용액은 다음과 같이 제조하였다.

1g MAXATASE 분말(2.372×10^6 Delft Units/g)에 탈이온수 25ml를 첨가하였다. 5-10분간 잘 흔들었다. 불용물을 소르볼 원심분리기의 SS 34 회전자에서 10,000rpm에서 원심분리에 의해 제거하였다. 상징액을 0.22μ MILLIPORER 여과기를 통하여 여과하였다. 다음에 여액을 10% 탈지유 리터당 첨가하였다. 접종된 탈지유를 250-300rpm으로 케도 셰이커에서 20℃에서 48시간 동안 셰이크 플라스크에서 흔들었다. 다음에 액즙을 8-10℃에서 10,000g에서 소르볼 GSA 회전자에게 원심분리하였다. 얻은 상징액을 완충액을 2회 교체하여 24시간에 걸쳐 4℃에서 pH 8의 10mM 트리스-HCl 완충액 50부피에 대해 EDTA 처리된 투석관에서 투석하였다. 투석후, 투석 주머니와 내용물을 모은 다음 동결건조시켰다.

비슷한 방법으로, CBS 473.85(KCTC 8228P)를 제외하고 실시예 1에서 언급한 모든 다른 균주로 발효를 수행하였다. 이 실시예에 따라 얻은 리파아제 함유 상징액(균주 M-1으로부터의 리파아제는 제외)을 실시예 9와 10에 기술된 실험에 대해 사용하였다.

[실시예 3]

균주 M-1의 리파아제 발효의 동결건조된 상징액의 제조

슈도모나스 슈도알칼리렌스 균주 M-1(CBS 473.85, KCTC 8228P)를 500ml 원추형 플라스크의 500ml 살균한 브레인 하아트 주입(BHI) 배지(Difco)에 접종시켰다. 배지를 280rpm에서 케도 셰이커에서 30℃에서 18시간 동안 흔들었다. BHI 성장세포를 살균배지 1 또는 배지 2 20ml를 함유하는 20ℓ 발효기에 접종시켰다.

- 배지 1은 다음과 같이 제조하였다 :

9.5ℓ 까지 탈이온수에 1000g 탈지유를 부유시킨다; 온도를 30℃로 가져오고 pH를 수산화나트륨 용액으로 7.8로 가져오고; 1시간동안 프로테아제 처리(30℃ 및 pH 7.0-7.8)를 위해 33×10^6 ADU(= 26×10^6 DU)MAXACAL[®] (기스트-브로케이드)을 첨가한다.

0.5-10ml 안티포움(SAG 471 또는 플루토닉 L-81)을 첨가한 후 오오토클레이브 시킹 : 110℃에서 30분.

- 배지 2를 다음과 같이 제조하였다 :

5 ℓ 탈이온수에 400g 카제인을 부유시킨다; pH를 9.0으로(수산화나트륨 용액으로) 가져오고 온도를 50℃로 가져온다; 프로테아제 처리를 위해 5×10^7 ADU(= 4×10^7 DU) Maxaca¹를 첨가한다; 배양(50℃ 및 pH = 9.0에서 90분)을 빠른 가열(90℃에서 5분 배양)에 의해 중지시킨다. 25℃로 냉각시킨 후, 황산첨가에 의해 pH를 7.0으로 조절한다.

다른 성분들(버터 50g; MgSO₄ · 7aq 5g; MnSO₄ · 4aq 0.1g과 안티포움 SAG 471 0.5-10ml)을 첨가하고 배지를 탈이온수로 10 ℓ 까지 채우고 오오토클레이브 시켰다 : 120℃에서 65분.

배지를 발효온도(30℃)로 냉각시켰다.

발효조건 : 공기흐름 : 0.167vvm,

교반 : 1000rpm,

pH : 6.5-10.0(바람직하게는 6.8-8.0)

발효는 35-72시간동안 계속하였다.

액즙을 헛티치(Hettich) 원심분리기(4000g, 8-10℃)에서 30분간 원심분리시켰다. 상정액을 0℃로 냉각시키고 고체(NH₄)₂SO₄를 70%(w/w)의 농도로 교반하면서 첨가하였다. 형성된 침전을 소르볼 원심분리기(10,000g, 4-5℃)에서 20-25분간 원심분리에 의해 상정액으로부터 분리하였다. 침전을 0℃의 10mM 트리스 HCl 완충액(pH 8)에 합하고 냉각된 아세톤(<-7℃)을 20분내에 첨가하여 65%(w/w)의 농도로 하였다. 원심분리후 침전을 10mm 트리스 HCl 완충액 pH 8과 합하고 4℃에서 같은 완충액 50부피에 대해 24시간 동안 완충액 2회 교체로 투석시켰다. 투석후, 물질을 동결 건조시켰고 얻은 활성은 6000TLU/g이었다.

유사한 방법으로, 그러나 다음의 약간의 수정으로 실시예 1에 언급한 모든 다른 균주를 얻을 수 있다 : 균주 Sp9에 대해 단지 배지 1을 사용할 수 있다; 발효온도는 모든 다른 균주에 대해 20℃이나, 균주 IN II-5에 대해서는 20 또는 30℃이다.

[실시예 4]

35, 40 및 50℃에서 8g ALL-기제/ℓ 에서 슈도모나스 슈도알칼리젠스 리파아제로 한 안정성실험

공급원 : 동결건조된 상정액

세제용액 : ALL-기제, 8g/l

pH : 표시한 바와 같음

[표 3a]

온도 : 35℃

리파아제 균주	pH	NPL/1×10 ⁻¹	시간(분)	잔유활성(%)
Sp 9	9	19	0	100
			15	104
			30	106
Sp 9	10.3	19	0	100
			15	88
			30	81
IN II-5	9	11	0	100
			15	107
			30	102
IN II-5	10.3	11	0	100
			15	87
			30	77

[표 3b]

온도 : 40℃

리파아제 균주	pH	TLU/1 또는 NPL/1×10 ⁻³	시간(분)	잔유활성(%)
Sp 9	9.0	14	0	100
			15	100
			30	99
Sp 9	10.3	14	0	100
			15	93
			16	83
IN II-5	9.0	22	0	100
			15	89
			30	79
IN II-5	10.3	22	0	100
			15	76
			30	57
Gr VI-15	10.3	5	0	100
			15	74
			30	61
M1	10.3	2.8	0	100
			15	63
			30	68

[표 3c]

온도 : 50℃

리파아제 균주	pH	NPL/1×10 ⁻³	시간(분)	잔유활성(%)
Sp 9	9.0	14	0	100
			15	95
			30	80
Sp 9	10.3	14	0	100
			15	56
			30	32
IN II-5	9.0	22	0	100
			15	60
			30	49
IN II-5	10.3	22	0	100
			15	27
			30	12
Gr VI-15	10.3	20.9	0	100
			15	43
			30	12
M1	10.3	25	0	100
			15	62
			30	54

[실시예 5]

4g ALL-기제/ℓ 에서 40 및 50℃에서의 일정한 슈도모나스 슈도알칼리젠스 리파아제로 한 안정성실험

a. 공급원 : 동결건조된 상징액

세제용액 : ALL-기제, 4g/l

pH : 표시한 바와 같음

온도 : 40℃

[표 4a]

리파아제 균주	pH	NPL/1×10 ⁻³	시간(분)	잔유활성(%)
Sp 9	9.0	14	0	100
			15	102
			30	102
Sp 9	10.3	14	0	100
			15	109
			30	98
IN II-5	9.0	22	0	100
			15	100
			30	99
IN II-5	10.3	22	0	100
			15	96
			30	82

b. 공급원 : 동결건조된 상징액
 세제용액 : ALL-기제, 4g/l
 pH : 표시한 바와 같음
 온도 : 50℃

[표 4b]

리파아제 균주	pH	NPL/1×10 ⁻³	시간(분)	잔유활성(%)
Sp 9	9.0	14	0	100
			15	97
			30	92
Sp 9	10.3	14	0	100
			15	77
			30	62
IN II-5	9.0	22	0	100
			15	100
			30	88
IN II-5	10.3	22	0	100
			15	60
			30	47

[실시예 6]

40 및 50℃에서 6g TIDE/ℓ 에서 슈도모나스 슈도알칼리젠스로 한 안정성실험
 공급원 : Sp 9의 동결건조된 상징액
 세제용액 : 표시한 바와 같음
 pH : 표시한 바와 같음

[표 5a]

온도 : 40℃

세 제	pH	NPL/1×10 ⁻³	시간(분)	잔유활성(%)
TIDE 마이너스	9.0	14	0	100
			15	118
			30	115
TIDE 마이너스	10.3	14	0	100
			15	106
			30	107
TIDE 플러스	9.0	14	0	100
			15	129
			30	127
TIDE 플러스	10.3	14	0	100
			15	118
			30	105

[표 5b]

온도 : 50℃

세 제	pH	NPL/1×10 ⁻³	시간(분)	잔유활성(%)
TIDE 마이너스	9.0	14	0	100
			15	107
			30	107
TIDE 마이너스	10.3	14	0	100
			15	79
			30	67
TIDE 플러스	9.0	14	0	100
			15	120
			30	127
TIDE 플러스	10.3	14	0	100
			15	81
			30	54

[실시예 7]

40℃에서 5g ALL-기제에서의 슈도모나스 슈튜제리 리파아제 Thai IV 17-1의 안정성실험

공급원 : Thai IV 17-1의 동결건조된 상징액

세제용액 : ALL-기제, 5g/ℓ .

pH : 9.0

[표 6]

온도 : 40℃

시간(분)	잔유활성(%)
0	100
25	109

[실시예 8]

40 및 50℃에서 8g ALL-기제에서와 아시네토박테르 칼코아세티커스 리파아제로 한 안정성실험

공급원 : Gr V-39(CBS 460.85, KCTC 8229P)의 동결건조된 상징액

세제용액 : ALL-기제, 8g/l

pH : 10.3

[표 7a]

온도 : 40℃

TLU/l × 10 ⁻³	시간(분)	잔유활성(%)
4.9	0	100
	15	100
	30	80

[표 7b]

온도 : 50℃

NPL/l × 10 ⁻³	시간(분)	잔유활성(%)
23.6	0	100
	15	27
	30	5

[실시예 9]

이 실시예는 SLM-시험에 따라 세척과정에서 리파아제 균주 슈도모나스 슈도알칼리젠스 Sp 9, IN 11-5, Gr VI-15, M-1, ATCC 29625, 슈도모나스 슈튜제리 Thai 11-5 및 아세토박테르 칼코아세티커스 Gr V-39의 성능을 예시하는데, 여기서 빌더성분을 가진 이들 효소의 접합성은 현대 세척조성물(TPP)에 존재하며, 분말세제 조성물(ALL-기제)과 액체조제(TIDE 액)를 검사하였다.

SLM-시험은 이 명세서의 28-30페이지에 기술된 대로 수행하였다. 예비시험은 사용한 조건하에 잔유 트리글리세트와 함께 리파아제에 의해 형성된 상당량의 지방산이 세척방법의 동안에 섬유에 머무름을 나타내었다.

상기한 리파아제와 바탕의 효능을 다음의 조건하에 SLM법에 의해 시험하였다.

- 알칼리로 pH 9.1로 조절된 표준수도물(STW)
- 소듐 트리포스페이트(TPP) : 2 및 10g/l(pH 9.1)
- 액체 TIDE : 2 및 4g/l(pH 7.5)
- ALL-기제 : 2,4 및 8g/l(pH 9.2-9.6)

첨가된 리파아제 활성단위(20TLU)는 실시예 2에 따라 제조된 동결건조된 샘플로부터 얻었고 균주 M-1의 경우에 실시예 3에 따라 얻었다.

그들은 다음과 같음을 발견하였다.

균주 활성 (TLU/g)	Sp 9	IN 11-5	Gr VI-15	M-1	ATCC 29625	Thai IV 17-1	Gr V-39
	70	130	50	6000	35	165	62.5

결과는 다음 표에 나타내었다.

[표 8a]

알칼리성 리파아제 : 없음(바탕)

조 건	(g/l)	회 수 율(%)
		트리글리세리드
STW	-	92.7
TPP	2	80.6
TPP	10	85.0
액체 TIDE	2	63.5
액체 TIDE	4	63.9
ALL-기재	2	65.3
ALL-기재	4	65.8
ALL-기재	8	63.4

[표 8b]

균주 Sp 9으로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	g/l	회 수 율(%)		
		트리글리세리드	유리지방산	합 계
STW	-	9.4	91.0	100.4
TPP	2	32.3	45.4	77.7
TPP	10	34.4	19.3	53.7
액체 TIDE	2	23.1	25.3	48.4
액체 TIDE	4	29.4	20.2	49.6
ALL-기재	2	24.1	30.4	54.5
ALL-기재	4	34.6	21.3	55.9

[표 8c]

균주 IN 11-5로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	g/l	회 수 율(%)		
		트리글리세리드	유리지방산	합 계
STW	-	20.4	68.3	88.6
TPP	2	11.6	61.0	72.6
TPP	10	39.3	6.3	45.6
액체 TIDE	2	35.6	16.0	51.6
액체 TIDE	4	37.8	13.3	51.1
ALL-기재	2	6.1	66.4	72.6
ALL-기재	4	20.6	30.6	51.2
ALL-기재	8	44.1	11.0	55.2

[표 8d]

균주 M-1으로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	g/l	회 수 율(%)		
		트리글리세리드	유리지방산	합 계
STW	-	9.3	75.9	85.2
TPP	2	24.7	38.8	63.5
TPP	10	32.8	9.9	42.7
액체 TIDE	2	33.3	12.0	45.3
액체 TIDE	4	37.5	16.4	53.9
ALL-기재	2	12.6	37.3	49.9
ALL-기재	4	29.1	15.7	44.8

[표 8e]

균주 Gr VI-15로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	g/l	회 수 율(%)		
		트리글리세리드	유리지방산	합 계
STW	-	22.0	59.3	81.3
TPP	2	24.1	48.5	72.6
TPP	10	31.5	28.1	59.6
액체 TIDE	2	49.3	9.5	58.8
액체 TIDE	4	54.4	0.0	54.4
ALL-기제	2	32.0	23.0	55.0
ALL-기제	4	37.3	15.6	52.9

[표 8f]

균주 ATCC 29625(시트롤리)로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	g/l	회 수 율(%)		
		트리글리세리드	유리지방산	합 계
STW	-	2.8	102.5	105.3
TPP	2	3.8	89.0	92.9
TPP	10	42.9	13.0	55.9
액체 TIDE	2	10.9	54.9	65.8
액체 TIDE	4	19.2	27.2	46.4
ALL-기제	2	24.7	40.5	65.2
ALL-기제	4	36.2	20.0	56.2

[표 8g]

균주 IV 17-1로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	g/l	회 수 율(%)		
		트리글리세리드	유리지방산	합 계
STW	-	4.3	75.3	79.6
TPP	2	24.7	27.9	54.7
TPP	10	44.6	10.1	54.8
액체 TIDE	2	21.2	29.3	50.5
액체 TIDE	4	24.6	17.9	42.6
ALL-기제	2	23.9	27.2	51.2
ALL-기제	4	47.0	10.0	57.0

[표 8h]

균주 Gr V-39로부터의 알칼리성 리파아제

H. 균주 Gr V-39로부터의 알칼리성 리파아제				
조 건	g/l	회 수 율(%)		
		트리글리세리드	유리지방산	합 계
STW	-	6.2	91.6	97.9
TPP	2	15.5	53.3	68.8
TPP	10	57.4	9.3	66.7
ALL-기제	2	28.6	16.8	45.3
ALL-기제	4	25.7	14.4	40.1
액체 TIDE	2	33.7	13.2	46.9

이들 표로부터 본 발명 리파아제는 섬유상에서 그들의 지방분해특성을 나타내고, 특히, 세척조건하에 액체 및 분말세제에서의 그들의 탁월한 효능을 나타낸다.

[실시예 10]

이 실시예는 세척조건하에 일정한 본 발명 리파아제와 표백 또는 단백질 분해효소의 적합성을 나타낸다. 리파아제의 효능은 다음의 조건하에 본 명세서의 28-30페이지에 기술된 바와 같은 SLM법에 의해 시험하였다 :

- ALL-기제+표백활성화제(TAED 3%) : 4g/l(pH 9.1)
- ALL-기제+TAED+표백제(NaBO3 · 4aq, 13%) : 4g/l(pH 9.1)
- ALL-기제+TAED+프로테아제(2000DU/g세제) : 4g/l(pH 9.1)

첨가된 리파아제 활성단위(20TLU)는 실시예 2에 따라, M1의 경우에는 실시예 3에 따라 제조된 동결 건조된 샘플로부터 얻었다(실시예 9 참조).

리파아제 균주 : IN 11-5, M1, Gr VI-15 및 ATCC 29625

프로테아제 : MAXATASE. MAXATASE의 단백질분해활성(DU/ℓ)은 J. Amer. Oil Chem. Soc. 60(1980), 1672에 기술된 델프트법에 따라 구하였다. 실시예 9에서와 같은 방법으로 표현된 결과를 다음표에 나타낸다.

[표 9a]

균주 11-5로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	회 수 율(%)		
	트리글리세리드	유리지방산	합 계
ALL-기제+TAED	4.4	62.4	66.8
ALL-기제+TAED+표백제	5.7	64.5	70.2
ALL-기제+TAED+MAXATASE	2.2	61.1	63.3

[표 9b]

균주 M-1로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	회 수 율(%)		
	트리글리세리드	유리지방산	합 계
ALL-기제+TAED	35.1	16.1	51.2
ALL-기제+TAED+표백제	38.1	14.9	53.0
ALL-기제+TAED+MAXATASE	41.5	10.0	51.6

[표 9c]

균주 Gr VI-15로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	회 수 율(%)		
	트리글리세리드	유리지방산	합 계
ALL-기제+TAED	42.0	7.4	49.4
ALL-기제+TAED+표백제	43.2	7.5	50.7
ALL-기제+TAED+MAXATASE	42.3	4.5	46.9

[표 9d]

균주 ATCC 29625로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	회 수 율(%)		
	트리글리세리드	유리지방산	합 계
ALL-기제+TAED	34.7	19.8	54.5
ALL-기제+TAED+표백제	32.6	27.5	60.1
ALL-기제+TAED+MAXATASE	36.4	22.4	58.8

[표 9e]

균주 IV 17-1로부터의 알칼리성 리파아제

조 건	회 수 율(%)		
	트리글리세리드	유리지방산	합 계
ALL-기제+TAED	31.0	17.2	48.2
ALL-기제+TAED+포백제	32.9	13.8	46.7
ALL-기제+TAED+MAXATASE	32.5	16.1	48.6

또한 이들 표로부터 본 발명 리파아제는 섬유상에서 그들의 지방분해특성을 나타내고 특히 세척조건 하에 액체 및 분말세제에서 그들의 탁월한 효능을 나타낸다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

영양배지에서 CBS 467.85(KCTC 8225P), CBS 468.85(KCTC 8226P), CBS 471.85(KCTC 8227P) 및 CBS 473.85(KCTC 8228P), 또는 그와 동일한 특성을 가지는 그의 변종 또는 돌연변이체로부터 선택되는 슈도모나스 슈도일칼리젠스 및 CBS 461.85(KCTC 8224P), 또는 그와 동일한 특성을 가지는 그의 변종 또는 돌연변이체로부터 선택되는 슈도모나스 스투제리로부터 선택된 세균성 균주를 배양하여 리파아제-부액을 형성하고 그 액즙으로부터 리파아제를 분리시켜 세척제에 사용하기에 적합한, 이하의 특징을 가지는 지방분해효소를 제조하는 방법 : a) TLU 결정의 조건하에서 pH 고정에서 측정할 때 8 내지 10.5 범위내의 최적 pH를 가지고, b) 60°C 이하의 온도 및 7 내지 11의 pH 조건의 세척하에서 10g/l 용액까지의 농도로 세제를 함유하는 수용액에서 효과적인 리파아제 활성을 나타낸다.

청구항 2

제1항의 방법에 의해서 얻어진 지방분해효소를 프로테아제 및 임의적으로 아밀라제와 혼합하는 것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 효소학적 세제 첨가제의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 지방분해효소의 첨가제의 10^2 내지 10^6 TLU/g 범위의 리파아제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 프로테아제가 첨가제의 5×10^4 내지 10^6 DU/g의 단백질 분해활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제2항 내지 제4항중 어느 한 항에 있어서, 효소학적 세제 첨가제가 과립 또는 환제의 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제2항 내지 제4항중 어느 한 항에 있어서, 효소학적 세제 첨가제가 효소 안정화제를 가진 액체의 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제2항의 방법에 의해서 얻어진 지방분해효소를 세척제 및 임의적 세척조성물에 통상 사용되는 다른 성분과 혼합하는 것을 이루어진 것을 특징으로 하는 세척조성물의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 지방분해효소가 조성물의 1 내지 20,000TLU/g 범위의 리파아제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 지방분해효소 이외에 단백질 분해효소 및 임의적으로 아밀라제를 포함시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 단백질 분해활성이 조성물의 50 내지 10,000Delft Units/g의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

pH가 7 내지 11의 범위이고 온도가 60°C 이하의 조건하에서 제7항에 의해서 제조된 세척조성물을 세

척용액에 10g/l까지 함유시켜서 세척하는 것을 특징으로 하는 세척방법.

청구항 12

pH가 7 내지 11의 범위이고 온도가 60℃ 이하의 조건하에서 제8항에 의해서 제조된 세척조성물을 세척용액에 10g/l까지 함유시켜서 세척하는 것을 특징으로 하는 세척방법.

청구항 13

pH가 7 내지 11의 범위이고 온도가 60℃ 이하의 조건하에서 제9항에 의해서 제조된 세척조성물을 세척용액에 10g/l까지 함유시켜서 세척하는 것을 특징으로 하는 세척방법.

청구항 14

pH가 7 내지 11의 범위이고 온도가 60℃ 이하의 조건하에서 제10항에 의해서 제조된 세척조성물을 세척용액에 10g/l까지 함유시켜서 세척하는 것을 특징으로 하는 세척방법.