

Dette er syvende artikel i en serie om vaskemidler anno 2005(-6). Serien startede i Dansk Kemi, 86, nr. 8, 9, 10 og 12 og 87, nr. 1 og 2 og afsluttes i næste nummer her på midtersiderne. Det overordnede formål er at gøre unge kolleger, elever og lærere opmærksomme på, at det er et interessant og udfordrende fagområde. Serien beskriver bl.a. vaskemiddelmarkedet, vaskemidler i dag, kemien i blegesystemer, tensider, øvrige ikke-enzymatiske ingredienser og udviklingen af enzymer til vaskemidler.

Enzymer til vaskemidler

– fra bugspytkirtler til gensplejsede mikroorganismer

I dag betragtes enzymer verden over som en selvfølgelig ingrediens i vaskemidler og maskinopvaskemidler. Baggrunden er et stykke enestående dansk industrihistorie

I. Tre klassiske enzymgrupper: proteaser, amylaser og lipaser

Af Thomas Callisen, Ture Damhus, Vibeke Skovgaard Nielsen, Peter Skagerlind, Detergent Applications, Novozymes A/S

Det hører med til almen dannelse i vaskemiddelkredse at vide, at »den tyske industrimagnat« Dr. Otto Röhm i 1913 udtog patent på anvendelse af fordøjelsesenzymer fra bugspytkirtler til fjernelse af besværligt smuds under tøjvask m.m. [1]. Röhm's idé var sådan set oplagt – vores krop, eller f.eks. grisens, producerer enzymer, der nedbryder de i føden forekommende substanser. Disse enzymer må også kunne bruges til at nedbryde madrester osv. på snavset tøj (patentet nævner specifikt fedt og proteiner). Se boks 1 om enzymer generelt.

I de næste næsten 50 år gjordes forskellige forsøg på at formulere vaske- og iblødsætningsmidler med enzymer fra bugspytkirtler, men med ringe succes, fordi disse enzymer fra naturens side er tilpasset fysiologiske betingelser (navnlig lavt

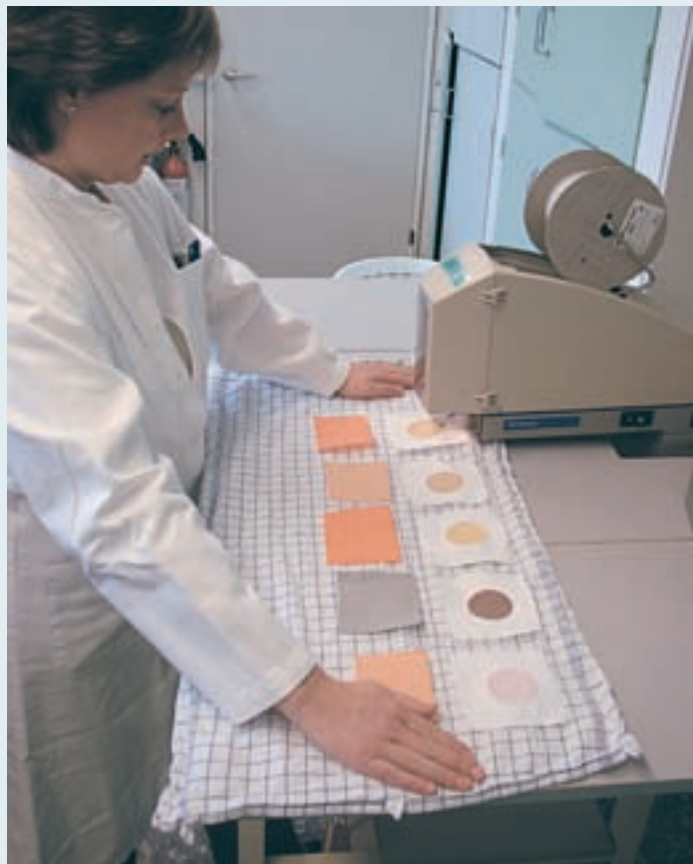
pH), som ligger langt fra betingelserne under vask med stærkt alkaliske vaskemidler. Ikke desto mindre kom firmaet Novo i gang med at producere enzymer, fordi man i forvejen havde fat i kirtlerne til insulinproduktion [2].

Gennembruddet kom imidlertid, da man begyndte at producere enzymerne ved gæring af mikroorganismer. Af to grunde: man fandt enzymer – først den bakterielle protease, der som Novo-produkt fik handelsnavnet Alcalase – som havde alkalisk pH-optimum (se boks 1), og så muliggjorde gæringerne en helt anderledes fordelagtig procesøkonomi end kirtelekstraktionerne.

Alcalase blev introduceret i forvaske- og iblødsætningsmidlet *Bio-tex* i 1963. Hurtigt bredte budskabet sig om den nye ingrediens, som muliggjorde fjernelse af pletter, der ellers var umulige at få has på. Markedet voksede hurtigt, da Alcalase også viste sig at fungere udmærket i fuldvaske. Men lige omkring 1970 tog sagen en skelsættende drejning. Ved et uheld blev nogle engelske arbejdere på en vaskemiddelfabrik udsat for enzymstøv, som de indåndede. Ikke så godt – mikrobielle enzymer er fremmedproteiner og som sådanne potentielle inhalationsallergener (se næste artikel). En forbruger- og pressekampagne, der gik i gang i USA, slog på, at der kunne være en tilsvarende risiko for forbrugere af de enzymholdige vaskemidler. Markedet forsvandt hurtigere, end det var kommet, og 400 medarbejdere af de dengang ca. 2100 ansatte på Novo blev fyret. Senere bekendtgjorde en amerikansk undersøgelseskommission, at der ingen risiko var for forbrugerne ved enzymholdige vaskemidler, og i mellemtiden havde Novo også udviklet ikke-støvende produkter (*prills*, se næste artikel), som muliggjorde sikker håndtering i fabrikkerne. Markedet vendte tilbage, men langsomt. Dette industrihistoriske interessante forløb er beskrevet i [2]. Udviklingen har faktisk været positiv lige siden. Til Alcalase føjede sig flere proteaser, amylaser, cellulaser, lipaser og siden flere enzymtyper, som vi vil beskrive i denne og den efterfølgende artikel.

Det næste afgørende spring fremad var indførelsen af genteknologi til frembringelse af ydedygtige stammer af mikroorganismer, der bliver brugt til en produktion af enzymer, som er stedse mere miljørigtig og økonomisk fordelagtig pga. lavere forbrug af gæringssubstrater, energi, materialer til oprensning osv. Lipaseproduktet Lipolase fra Novo, der blev lanceret i det japanske vaskemiddel *Hi Top* i forbindelse med producenten Lions 100-års jubilæum i 1988, var det første industrielle enzym produceret i en gensplejset værtsorganisme.

Serien her handler om vaskemidler, og vi kan ikke komme meget ind på industrielle enzymer i øvrigt. Novo blev til Novo-Nordisk i 1989 [2], stadig en kombineret lægemiddel- og en-



Figur 1. Chanette Schultz, Novozymes, i færd med at montere lapper med stivelsesbesmudsninger på et viskestykke før fuldskalavask. Jf. figur 2.

zymproducent, men så blev Novozymes skilt ud i 2000. Det er værd at bemærke, at med de tre store producenter Chr. Hansen, Danisco (herunder det USA-baserede datterselskab Genencor) og Novozymes er langt hovedparten af verdens produktion af industrielle enzymer faktisk på danske hænder i dag.

Der findes en række oversigtsværker, der enten beskriver industrielle enzymer i almindelighed [3-7] eller vaskemiddelenzymer i særdeleshed [8-10,13,15].

Proteaser

De fleste steder i verden regnes proteaser nu som en fast ingrediens i vaskemidler, da proteaser som nævnt på nogle plettyper øger vaskemidlets effekt i en grad, der ikke opnås af andre vaskemiddelingredienser.

Proteaser er *hydrolaser*, som katalyserer nedbrydningen af *proteiner*. Alle proteaser, som anvendes i vaskemidler i dag, er *serinproteaser* (se videre nedenfor) udviklet fra vildtyper produceret af *Bacillus*-arter. De virker i synergi med tensider, da proteasers delvise nedbrydning af proteinerne i en plet øger effekten af tensiderne, hvorved der ofte opnås en fuldstændig fjernelse af den proteinbaserede plet. Eksempler på pletter, som fjernes med proteaser i vaskemidler, er græs, spinat, mælk, mælkebaserede fødevarer som kakaomælk, æg, kødbaserede fødevarer og blod. Det sidste er særlig interessant, fordi blegemidler i vaskemidler tenderer til at vanskeliggøre fjernelsen af blodpletter. Proteaser kan i princippet modvirke dette, men det er en delikat sag at teste for, da hele scenariet under vasken (opløsningshastighed for vaskepulverets en-

kelte bestanddele m.v.) er afgørende for, hvem der »vinder«, og disse konkurrerende effekter gør det også til en udfordring at teste proteaser på blod i blegemiddelholdige vaskemidler.

Proteasers effekt under vask påvirkes af flere faktorer såsom vaskemidlets pH, vasketemperaturen og vandets indhold af både hårdhedsioner (se boks 3 i artikel 1) og chlorforbindelser (ved chlorering af ledningsvand). Desuden påvirkes proteaser i en vis udstrækning af de øvrige vaskemiddelkomponenter, herunder blegemidler og sammensætningen af tensidsystemet. Da der vaskes meget forskelligt rundt om i verden (både mht. vaskemiddelsammensætning og vaskebetingelser), og på grund af den store udbredelse af proteaser i vaskemidler, er der udviklet en række forskellige proteaseprodukter i løbet af de seneste 20 år. Ved brug af *protein engineering*, dvs. systematisk udskiftning vha. genteknologi af bestemte aminosyrer mhp. ændring af enzymets egenskaber, er der udviklet

- proteaser med høj effekt i flydende vaskemidler med lavt pH
- proteaser med høj effekt i vask ved lav temperatur
- proteaser, der er mere stabile i blegemiddelholdige pulvervaskemidler
- en protease med høj effekt i områder med meget lav vandhårdhed

En komplikation ved anvendelse af proteaser i flydende vaskemidler er, at proteaser, idet de selv er proteiner, kan nedbryde sig selv, når vaskemidlet står på hylden i supermarkedet eller der-

Boks 1: Crash-kursus i enzymologi

(Hav en god biokemi- eller proteinkemilærebog ved hånden.)

Enzymer er *katalytiske proteiner*. Alle organismer producerer enzymer, som de bruger til at hjælpe sig med forskellige livsprocesser. Den moderne produktion af industrielle enzymer er baseret på mikroorganismer, dvs. bakterier og svampe.

Enzymer har visse generelle karakteristika, som er vigtige for anvendelsen:

De er positivt ladede ved lavt pH og negativt ladede ved højt pH. Et sted derimellem har de et *isoelektrisk punkt* [pI, eller pH(I) på IUPAC'sk], hvor de er elektrisk neutrale.

Aktive enzymmolekyler har en 3D-struktur bestemt af hydrogenbindinger og eventuelt tilstedeværende metalioner [f.eks. calcium(2+)] eller *prostetiske grupper* (lavmolekylære forbindelser indlejret i den foldede polypeptidkæde, eventuelt bundet kovalent til den; eksempel: hem, der kendes fra hemoglobin, optræder også i mange enzymer). Begreberne *primær, sekundær, tertiær og kvaternær struktur* er vigtige som i proteinkemi generelt. Binding og processering af substratmolekyler sker normalt på et ganske bestemt sted i enzymmolekylet, kaldet *active site* eller på dansk f.eks. det aktive eller katalytiske center.

Molmasser for de enzymer, vi omtaler her i serien, ligger normalt i intervallet fra ca. 25 til 60 kDa. Ved foreskrevet dosering af vaskemidler i husholdningen er typiske niveauer af aktivt enzymprotein i vaskevæsken fra nogle få mg/L og nedefter, så der er tale om koncentrationer i nM-området.

Enzymers aktivitet som katalysatorer udviser normalt en pukkelformet kurve som funktion af temperaturen, dvs. der er en optimal temperatur. Ved høj temperatur denatureres de, dvs. polypeptidkæden udfoldes, og aktiviteten forsvinder. Ofte, men ikke altid, er denne proces irreversibel. Med en pædagogisk lidt uheldig fagjargon siger man, at enzymet »dør«.

Som regel udviser aktiviteten også et pukkelformet forløb som funktion af pH, dvs. der er en bestemt pH-værdi (eller et pH-interval), hvori aktiviteten er maksimal.

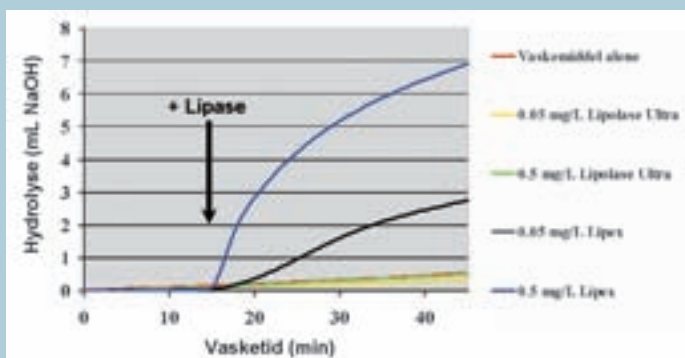
Enzymers aktivitet kan hæmmes af både deres substrater, altså reaktanter i de reaktioner, de katalyserer, af deres produkter og af andre molekyler (hæmmere eller inhibitorer).

Enzymkinetik [20] er disciplinen, hvori enzymernes katalytiske evne studeres kvantitativt. Da nedbrydning af praksisrelevante substrater som proteiner og stivelse er særdeles komplicerede processer, anvendes ofte simple, kunstige substrater i sådanne undersøgelser, indrettet så reaktionen kan følges ved absorptions- eller fluorescensmålinger. Eksempelvis ved proteasestudier 4-nitroanilider af små peptider, hvor proteasen fraspalter 4-nitroanilin. Sådanne

bekvemte substrater anvendes også i *aktivitetsassays*, dvs. analytiske metoder til standardisering af enzympræparaters aktivitet.

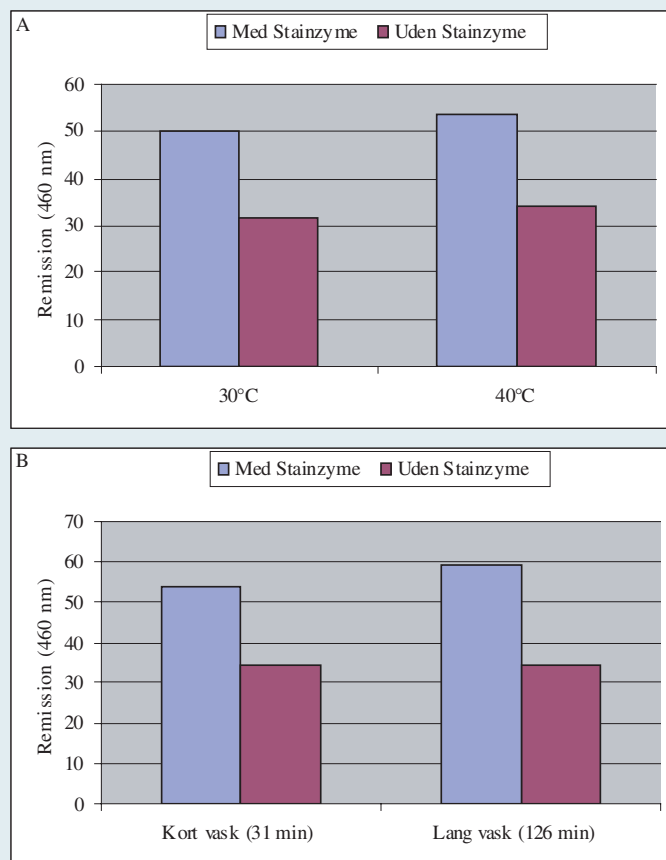
Reaktionshastigheden af hydrolyseprocesser, ved hvilke der dannes titrerbare syregrupper, kan måles i *real time* ved *pH-stat-titrering* (jf. figur 5), en teknik hvormed pH fastholdes og man måler tilsat mængde kompenserende base (OH⁻) som funktion af tiden. Sådanne titreringer anvendes i aktivitetsassays af navnlig lipaser. I [8] eksemplificeres anvendelse af metoden til studier af proteasekatalyseret hemoglobinnedbrydning i vaskemiddelopløsninger.

Enzymer inddeles i 6 klasser (*oxidoreductaser, transferaser, hydrolaser, lyaser, isomeraser og ligaser*) med talrige underklasser identificeret ved EC-numre [21,22]. Enzymnomenklatur adskiller sig fra systematisk kemisk nomenklatur ved at basere sig primært på den katalyserede reaktion. Det er både godt og skidt. Ofte er underklasserne i EC-systemet overlappende, og hyppigt må der omklassificeres, når flere data er genereret for et givet enzym. I vore dage er identifikation vha. aminosyresekvenser og gener, røntgenkystalstrukturer, NMR-baserede strukturer og computersimulerede strukturer derfor mindst ligeså vigtige for klassifikationen af enzymer. Disse informationer findes i store databaser, og den nye disciplin *bioinformatik* er vigtig for udnyttelsen af disse informationer.



Figur 5. Eksempel på pH-stat-titrering: substratet er fløde påført stoflapper, som titreres i en brugsupløsning af et flydende USA-vaskemiddel (pH justeret til 9) i nærvær af to lipaser i praksisrelevante doseringer. I begge doseringer skiller den nye lipase Lipex sig klart ud fra Lipolase Ultra, en tidligere vaskemiddellipase. Dette titreringsresultat korrelerer med, at Lipex udviser tydelig vaskeeffekt ved første vask. Jf. kommentar ved [15].

hjemme. Dette kaldes autoproteolyse. Desuden kan proteaser nedbryde de øvrige enzymtyper i vaskemidlet. For at forhindre dette tilsættes de flydende vaskemidler ofte reversible proteaseinhibitorer som borsyre eller derivater af boronsyre [11].



Figur 2. Vaskeeffekt af Stainzyme målt som ændring af gennemsnitlig remission (ordet dannet af refleksion + emission) ved 460 nm af seks tekniske, ældede stivelsesbesmudninger. Dataene er genereret i fuldskalavaskeforsøg med de tekniske lapper monteret på viskestykker som vist i figur 1.

Amylaser

Amylaser [af *amylum* (latin), stivelse] er stivelsesnedbrydende hydrolaser. Amylaser har været anvendt i vaskemidler siden 1973, og efterspørgslen er stadig stigende. En grund hertil er, at mange fødemiddelprodukter, f.eks. babymad, frugtpuréer, chili- og spaghettisaucer, ketchup og chokoladebudding, indeholder stivelse eller kemisk modificerede stivelsestyper, bl.a. for at opnå den rette konsistens.

Fjernelse af stivelse fra tekstiloverflader er ikke bare vigtig for at komme af med synlige pletter, men også fordi stivelse er tilbøjelig til at danne en usynlig film, som kan samle partikulært smuds (sod, lerpartikler osv.) op både under brug og under vask. Resultatet er, at ellers hvidt vasketøj bliver mere og mere gråt efter gentagne vaske. Dette kan altså modvirkes ved brug af amylaser [8,12]. En tilsvarende *anti-redepositionseffekt* er illustreret ved lipaser nedenfor.

Stivelse består generelt af to polymere komponenter: *amylose*, som er uforgrenet poly(glucose) med udelukkende α -1,4-bindinger mellem glucoseenhederne, og *amylopectin*, som ud over α -1,4-bindingerne også indeholder α -1,6-forgreningspunkter. De såkaldte α -amylaser spalter interne 1,4-bindinger i begge stivelseskompontener og er derfor ideelt egnede til at øge opløseligheden af stivelsen og dermed lette fjernelsen under vask.

Vaskemiddelamylaser er i dag hovedsageligt bakterielle α -amylaser, som stammer fra *Bacillus*-arter. De har høj indbyrdes homologi (overensstemmelse i aminosyresekvensen) og typisk en tertiær struktur bestående af tre domæner kaldet A, B og C [13]. Det

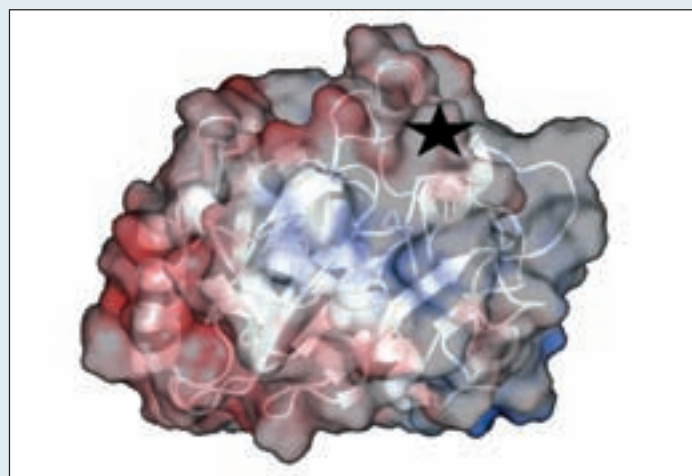
aktive center ligger ofte i en kløft mellem A og B og består af aminosyrer som asparaginsyre og glutaminsyre med sure sidekæder. Ligesom mange proteaser indeholder de fleste α -amylaser calciumioner, som er essentielle for at opretholde den tertiære struktur og dermed den katalytiske aktivitet, når enzymet stresses, eksempelvis ved påvirkning fra blegesystemer i vaskemidler. Læseren vil kunne forstå, at der her er lagt op til en delikat balancegang i forbindelse med vaskemidlernes buildersystemer (se artikel 4 i serien), som naturligvis vil være tilbøjelige til også at frarøve sådanne enzymer deres calciumioner. Amylasernes blegemiddelfølsomhed kan (ligesom proteasernes) spores til en methionin placeret nær det aktive center og er specifikt blevet adresseret ved udskiftning af denne ved protein engineering [13].

I 2004 introduceredes en ny amylase, Stainzyme, som udviser en betydeligt stærkere vaskeeffekt i de fleste markedssegmenter end tidligere kommercielle amylaser. Dette enzym har bredere pH- og temperaturprofiler end forgængerne, hvilket bl.a. betyder, at det leverer stort set samme effekt ved 30°C som ved 40°C, se figur 2A. Ydermere kan vasketiden reduceres, uden at man mister effekt (figur 2B).

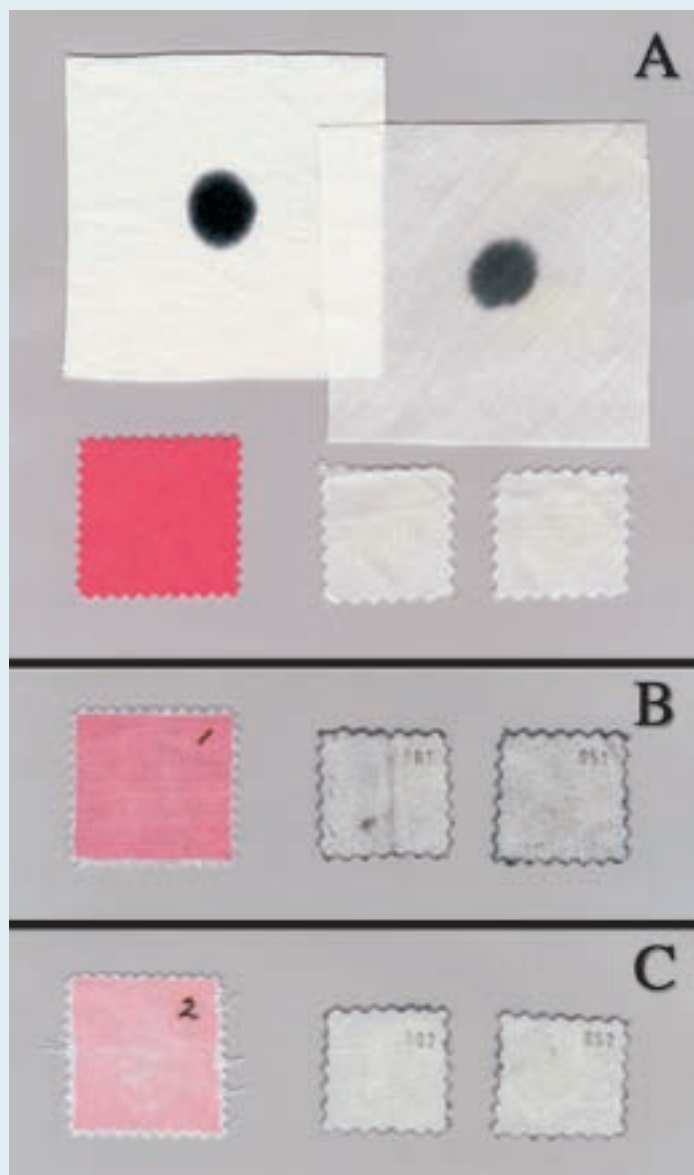
Lipaser

De lipaser, som p.t. anvendes i vaskemidler, er *glyceridlipaser*, der katalyserer den hydrolytiske spaltning af tungtopløselige tri-*O*-acylglyceroler (triglycerider) som animalsk fedt og vegetabiliske olier til de mere vand/tensid-opløselige slutprodukter: glycerol og frie fedtsyrer [14,15]. Flere af de nyere vaskemiddellipaser har afsæt i Lipolase, omtalt i indledningen, som er en vildtype fra svampen *Thermomyces lanuginosus*, og er beslægtede med en anden familie af hydrolaser, nemlig serinproteaserne. Disse to typer hydrolaser har begge samme type aktivcenter bestående af en *triade* af aminosyrer (serin, asparaginsyre og histidin), der er centrale for den katalytiske funktion. Adgangen til aktivcentret hos lipaserne går gennem en hydrofob kløft, der i vandigt miljø er beskyttet af et »låg«-segment, som ændrer konformation, når lipasens omgivelser bliver mindre hydrofile. Se figur 3: strukturen af den senest markedsførte vaskemiddellipase, Lipex.

Mange enzymer, som anvendes i vaskeprocesser, har det til



Figur 3. Molekylstrukturen for den 31 kDa store glyceridlipase kaldet Lipex, dannet ud fra røntgenkrystallografiske data for den nært beslægtede Lipolase ved at udskifte de aminosyrer, som adskiller de to enzymer, og siden at minimere strukturens fri energi vha. computermodellering. Spiralerne angiver helixsegmenter, mens båndene med pile repræsenterer β -sheets. De tynde streger i strukturen henviser til segmenter, der ikke har en længerevækkende sekundær ordning (også benævnt random coil). Flere detaljer om lipasens struktur og fundamentale egenskaber kan findes i [16]. Strukturen er indlejret i en sky som i sin farvekode angiver lipasens overfladepotential ved pH 7 i en afstand af 1.4 Å fra overfladen, hvor skalaen går fra negativ ladning (rød) over neutral (grå) til positiv ladning (blå). Stjernen angiver den hydrofobe kløft, der fører ind til det aktive center. Åbningen er variabel som følge af det bevægelige låg over kløften. Figuren er venligst lavet af Esben P. Friis, Novozymes.



Figur 4. Smudsjernelses- og anti-redepositionseffekter ved brug af en lipase i et modelvaskeforsøg.

(A) viser et udvalg af testlapper, som indgår i forsøget, før vasken: lapper homogent besmudsede med læbestift baseret på vegetabiliske fedtstoffer, smudsballast-lapper påført svinefedt med 100 nm store carbon black-partikler samt rene lapper til sporing af redeposition.

I (B) ses en læbestiftlap og to af de oprindeligt hvide sporingslapper efter vask med et europæisk vaskepulver.

(C) viser tilsvarende lapper fra en tilsvarende vask, blot er der nu tilsat 0.2 mg Lipex/L til vaskemiddelopløsningen.

Lipasens effekt ses både som øget smudsjernelse og reduceret redeposition.

fælles, at de bl.a. virker på overflader, hvilket skal forstås i bredeste betydning: på rene og besmudsede flader på tøjemnerne i vasken og på overflader af emulgerede eller suspenderede partikler, jf. artikel 5 om tensider. For at opnå den optimale funktion af enzymerne skal bl.a. deres affinitet til, og diffusion på, disse overflader afstemmes, således at enzymerne opholder sig der, hvor de gør mest gavn (jf. [16,17]). Denne optimering af egenskaber for enzymerne er særdeles udfordrende; man benytter sig ofte af en kombination af *protein engineering*, *high-throughput screening*, *anvendelsesforsøg* i realistisk skala samt *mekanistiske studier*, jf. [18] om bioteknologisk produktion af enzymer. I relation til lipaser går optimeringen dels på at maksimere fjernelsen af fedt- og olieholdige pletter, dels på at reducere lipasernes restaktivitet på acylglyceroler, der kan omdannes til flygtige og ildelugtende fedtsyrer (typisk fra mælkeprodukter).

Lipaser kan, som andre enzymer, ud over at fjerne synligt smuds, have anti-redepositionsvirkning. Figur 4 (som er en udvidelse af figur 4 i artikel 5), illustrerer, hvilke forskelle lipasen kan give anledning til i vaskeforsøg, hvor niveauet af fedt, fedtopløselige farvestoffer og partikulært materiale er højt. I figur 4(B) ses, at *carbon black*-partikler overføres til de hvide sporingslapper; endvidere bemærkes en gråfarvning af læbestiftlappen. Tensidsystemet er i dette forsøg stresset af den høje mængde smuds, hvorved suspensionen af *carbon black*/svinefedt ikke er effektiv. Hydrofobe smudspartikler vil i almindelighed under sådanne betingelser være tilbøjelige til at deponere på hydrofobe overflader som polyesterstof eller skjorte kraver med rester af hudfedt eller, som i dette eksperiment, delvis renavskede »aftryk« af læbestift. Når lipasen medtages i vaskeforsøget, reduceres redepositionen i tilgift til, at læbestiftlappen vaskes renere, se figur 4(C). (Disse lipaseeffekter er yderligere blevet dokumenteret med mikroskopi og pH-stat-forsøg [19]).

E-mail-adresser

Thomas Callisen: call@novozymes.com

Ture Damhus: tda@novozymes.com

Vibeke Skovgaard Nielsen: visn@novozymes.com

Peter Skagerlind: pesk@novozymes.com

Referencer

1. Tyske patenter #283923 (1913) og tillæg #329958 (1915) til 'Dr. Otto Röhm in Darmstadt'. Begge patentskrifter er på 1 side. Interessant at sammenligne med vore dages patenter på vaskemiddelingsredienser, som kan fylde mange hundrede sider i de værste tilfælde.
2. H. Richter-Friis: *Livet på Novo* [Gyldendal 1991].
3. H.S. Olsen: *Enzymes at work* [58 pp.; Novozymes A/S, 2004]. Publikationen kan fås ved henvendelse til Novozymes og findes også som pdf-fil på www.novozymes.com.
4. Afsnittet *Enzyme Applications, Industrial* i Kirk-Othmer: *Encyclopedia of Chemical Technology* [Wiley 2004].
5. W. Aehle: *Enzymes in Industry* [2nd Ed., Wiley 2004].
6. O. Kirk *et al.*: Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology* **13** (2002) 345-351.
7. T. Schäfer *et al.*: Industrial Enzymes, i *Biochemical Engineering/ Biotechnology*, special volume: *White biotechnology* [Springer, i trykken].
8. H.S. Olsen, P. Falholt: The Role of Enzymes in Modern Detergency, *J.Surf.Det.* **1** #4 (1998) 555-567.
9. J.H. van Ee, O. Misset, E.J. Baas (Eds.): *Enzymes in Detergency, Surfactant Science Series Vol. 69* [Marcel Dekker, 1997].
10. E. Gormsen, E. Marcussen, T. Damhus: Enzymes, pp.137-163 i M.S. Showell (Ed.): *Powdered Detergents, Surfactant Science Series Vol. 71* [Marcel Dekker, 1997].
11. N. Prieto, D. Kochavi, R. Hamburger, V.S. Nielsen: A new enzyme stabilizer for liquid detergents, *Inform* **13** (2002) 731-733.
12. K. Gibson: The importance of detergent amylases for whiteness maintenance, *Riv.Ital.Sost.Grassie* **75** (1998) 207-211.
13. Y.M. Galante, C. Formantici: Enzyme Applications in Detergency and in Manufacturing Industries, *Curr.Org.Chem.* **7** (2003) 1399-1422.
14. E. Gormsen: Brug af fedtspaltende enzymer i vaskemidler, *Dansk Kemi* **72** (1991) 160-163.
15. N. Eriksen: *Detergents*, kap. 2 i T. Godfrey, S. West (Eds.): *Industrial Enzymology – The Application of Enzymes in Industry* [2nd Ed., Groves Dictionaries, 1996]. Bemærk, at beskrivelsen heri af Lipolase, som først præsterer vaskeeffekt efter 2 eller flere vaskecykler, er overhalet af udviklingen af nyere lipaser. Jf. figur 5.
16. A. Svendsen: Lipase Protein Engineering, *Biochem.Biophys.Acta* **1543** (2000) 223-238.
17. (a) A. Sonesson *et al.* (2005), ref. 7 i artikel 5 i serien.
(b) A.W. Sonesson, T.H. Callisen, H. Brismar, U. Elofsson: Lipase Surface Diffusion Studied by Fluorescence Recovery after Photobleaching, *Langmuir* **2005**, 21, 11949-11956.
18. M. Bjørnvad, T.V. Borchert, S. Ernst: Optimering af proteineres funktion, *Dansk Kemi* **84**, særtillæg i # 11, om bioteknologi (2003) 15-18.
19. T.H. Callisen, T. Damhus (2000), ref. 8 i artikel 5 i serien.
20. H.C. Jensen, J. Schiødt, U. Christensen: *Enzymkinetik* [Kemi Forlaget 2005].
21. Se <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>. Dette er hjemmesiden *Enzyme Nomenclature* for Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.
22. Underafsnittet *Enzyme Classification and Nomenclature* i [4].