(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 902 T2** 2006.08.03

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 631 622 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 902.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK93/00074**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 906 457.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1993/018140**
(86) PCT-Anmeldetag: **03.03.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **16.09.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.01.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.08.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 9/54*** (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
28792 **04.03.1992** **DK**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, DE, DK, ES, FR, GB, IT, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

(72) Erfinder:
OUTTRUP, Helle, DK-2750 Ballerup, DK;
DAMBMANN, Claus, DK-2860 Soeborg, DK;
AASLYNG, Anita, Dorrit, DK-4000 Roskilde, DK;
LINDEGAARD, Poul, DK-2100 Copenhagen ., DK

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGE PROTEASEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

FACHGEBIET

[0001] Diese Erfindung betrifft das Gebiet von Detergensproteasen, die von Stämmen von Bacillus sp abgeleitet sind. Insbesondere betrifft die Erfindung eine neue alkalische Protease, die von dem Stamm PD138 von Bacillus sp. erhältlich ist. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Protease, die Verwendung der Protease als Detergensenzym und die Protease der Erfindung umfassende Detergenszusammensetzungenen.

STAND DER TECHNIK

[0002] Detergensenzyme wurden mehr als 20 Jahre lang vertrieben und sind nun weltweit als normale Detergensinhaltsstoffe sowohl in pulverförmigen als auch flüssigen Detergenzien etabliert. Mit dem Trend zum Waschen bei niedrigen Temperaturen nahm in den letzten Jahren der Detergensenzymverbrauch zu. Enzyme, die in Waschformulierungen verwendet werden, umfassen Proteasen, Lipasen, Amylasen, Cellulasen sowie andere Enzyme oder Gemische davon. Proteasen sind wirtschaftlich am bedeutsamsten.

[0003] Detergensproteasen wurden durch Isolierung von in der Natur zu findenden Proteasen entwickelt und anschließend in Detergensformulierungen getestet. Die meisten Detergensproteasen sind von Vertretern der Gattung Bacillus erhältlich. Laufend gehen Proteasetypen auf den Markt, die die Möglichkeit bieten, ein besseres Kosten/Leistungsverhältnis unter verschiedenen spezifizierten Bedingungen zu erhalten.

[0004] Beispiele für im Handel erhältliche Proteaseprodukte sind ALCALASE™, ESPERASE™ und SAVINASE™, alle bereitgestellt von Novo Nordisk A/S, Dänemark. Diese und ähnliche Enzymprodukte von anderen kommerziellen Quellen sind in Detergenslösungen, d.h. bei pH-Werten von Bereich von 8–11 und in Gegenwart von Maskierungsmitteln, oberflächenaktiven Mitteln und Bleichmitteln wie Natriumborat aktiv. Die ALCALASE™-Protease wird durch Stämme der Spezies Bacillus licheniformis hergestellt. Die ESPERASE™ und SAVINASE™-Proteasen sind durch Züchten von Stämmen von alkalophilen Bacilli erhältlich.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Detergensproteasen mit verbesserter Waschleistung bei hohem pH-Wert und hoher Ionenstärke bereitzustellen.

[0006] Demzufolge stellt die Erfindung in einem ersten Aspekt eine Protease mit einem wie durch SDS-PAGE bestimmten scheinbaren Molekulargewicht von 28 kD, einem pI über 9,5, einem pH-Optimum über 10 (bei 25°C und mit Casein als Substrat), einem Temperaturoptimum im Bereich von 45 bis 55°C (bei pH 9,5 und mit Casein als Substrat) und immunochemischen Eigenschaften, die mit denjenigen identisch sind, die vom Stamm PD138, NCIMB 40338 von Bacillus sp. erhältlich sind.

[0007] In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung eine isolierte, biologisch reine Kultur des Stamms PD138 von Bacillus sp. In einem spezifischeren Aspekt betrifft die Erfindung den Stamm PD138, NCIMB 40338 von Bacillus sp.

[0008] In einem dritten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Protease bereit, wobei das Verfahren das Züchten des Protease-erzeugenden Stamms PD138, NCIMB 40338 von Bacillus sp. in einem geeigneten Nährstoffmedium, enthaltend Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze, gefolgt von der Gewinnung des gewünschten Enzyms umfasst.

[0009] In einem vierten Aspekt ist die Verwendung des Enzyms als Detergensenzym beansprucht. In spezifischeren Aspekten stellt die Erfindung Protease umfassende Detergenszusammensetzungen und Detergenszusätze bereit.

[0010] In einem fünften Aspekt stellt die Erfindung ein Waschverfahren bereit, das die Zugabe der Protease umfasst.

KÜRZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0011] Die vorliegende Erfindung wird weiter unter Bezugnahme auf die begleitenden Zeichnungen veran-

schaulicht, in welchen

[0012] Fig. 1 die Beziehung zwischen Temperatur und der proteolytischen Aktivität eines erfindungsgemäßen Enzyms (des Enzympräparats, erhältlich gemäß Beispiel 1 mit 2% Casein als Substrat und bei pH 9,5; ▪ Puffer, □ Puffer + 0,1% STPP) zeigt,

[0013] Fig. 2 die Beziehung zwischen pH-Wert und proteolytischer Aktivität eines erfindungsgemäßen Enzyms (des Enzympräparats, erhalten gemäß Beispiel 1 mit 2% Casein als Substrat und bei 25°C) zeigt.

DETAILLIERTE OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Der Mikroorganismus

[0014] Der neue Mikroorganismus der Erfindung, der ein Enzym der Erfindung herstellen kann, ist durch den Stamm dargestellt, der aus einer Probe jamaikanischer Erde isoliert wurde. Bacillus sp. PD138 wurde gemäß dem Budapester Vertrag unter der Internationalen Anerkennung der Hinterlegungen von Mikroorganismen zum Zwecke von Patentverfahren am 3. Dezember 1990 bei der National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Schottland, UK, unter der Zugangsnummer NCIMB 40338 hinterlegt.

[0015] Der Mikroorganismus dieser Erfindung ist ein aerobes sporenbildendes Bakterium, das zur Gattung Bacillus gehört. Morphologisch kann es als frei bewegliche Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,7–0,9 und einer Länge von 2–3 Mikron beschrieben werden. Die Sporen sind rund bis ellipsenförmig, blähen den Sporenbehälter nicht auf, liegen zentral bis subterminal. Eine optimale Temperatur für das Wachstum liegt innerhalb von 25–37°C und der optimale pH-Wert für das Wachstum liegt innerhalb von 7–9, kein Wachstum bei pH 9,7 und kein Wachstum bei 50°C. Der Mikroorganismus bildet auf Nähragarschrägen gelbliche bis gelbe Kolonien, die rund und glatt sind, und es wird keine Pigmentdiffusion in das Agar beobachtet.

Züchtung des Mikroorganismus

[0016] Der Mikroorganismus der Erfindung kann unter aeroben Bedingungen in einem Nährstoffmedium, enthaltend vergleichbaren Kohlenstoff und Stickstoff zusammen mit anderen essentiellen Nährstoffen, gezüchtet werden, wobei das Medium gemäß den auf dem Fachgebiet bekannten Prinzipien zusammengesetzt ist.

[0017] Geeignete Kohlenstoffquellen sind Kohlenhydrate wie Saccharose, Glucose und Stärke oder Kohlenhydrate enthaltende Materialien wie Getreidekorn, Malz, Reis und Hirse. Die in das Medium eingebrachte Kohlenhydratkonzentration kann z.B. bis zu 25% und herab auf 1–5% breit variieren, jedoch sind gewöhnlich 8–10% geeignet, wobei die Prozentgehalte als Glucoseäquivalente berechnet sind.

[0018] Die Stickstoffquelle im Nährstoffmedium kann von anorganischer und/oder organischer natur sein. Geeignete Stickstoffquellen sind Nitrate und Ammoniumsalze. Unter den organischen Stickstoffquellen wird regelmäßig bei Fementationsverfahren unter Beteiligung der Züchtung von Bakterien eine ganze Anzahl verwendet. Veranschaulichende Beispiele sind Sojabohnemnehl, Baumwollsamenmehl, Erdnussmehl, Casein, Mais, Maisweichflüssigkeit, Hefeextrakt, Harnstoff und Albumin. Zudem sollte das Nährstoffmedium auch übliche Spurenstoffe enthalten.

[0019] Die neuen Bacillus-Spezies dieser Erfindung sind leicht alkalophil. Deshalb wird die Züchtung vorzugsweise bei leicht alkalischen pH-Werten durchgeführt, die durch Zugabe von geeigneten Puffern wie Natriumbicarbonat, pH 9,0, nach der Sterilisation des Wachstumsmediums erhalten werden können. Zur Züchtung in Tankfermentatoren ist es nötig, künstliche Belüftung zu verwenden. Die Belüftungsrate ähnelt derjenigen, die in herkömmlicher Tankfermentation verwendet wird.

[0020] Nach der Fermentation können die flüssigen Enzymkonzentrate durch Entfernung von grobkörnigem Material aus der Brühe oder, falls gewünscht, durch Einengen der Brühe durch Eindampfen bei niedriger Temperatur oder durch Umkehrosmose hergestellt werden. Schließlich können dem Konzentrat Konservierungsmittel zugesetzt werden.

[0021] Feste Enzympräparate können aus der gereinigten und/oder eingeengten Brühe durch Ausfällung mit Salzen wie Na_2SO_4 oder wassermischbaren Lösungsmitteln wie Ethanol oder Aceton hergestellt werden. Die Entfernung des Wassers in der Brühe durch geeignete Trocknungsverfahren wie Sprühtrocknen kann eben-

falls eingesetzt werden.

Test auf elelctrolytische Aktivität

[0022] Die proteolytische Aktivität wurde mit Casein als Substrat bestimmt. Eine Caseinproteaseeinheit (CPU) ist als die Enzymmenge definiert, die 1 mM primäre Aminogruppen (bestimmt durch Vergleich mit einem Serinstandard) pro Minute unter Standardbedingungen, d.h. Inkubation für eine Dauer von 30 Minuten bei 25"C und pH 9,5 freisetzt. Das das analytische Verfahren beschreibende Faltblatt AF 228 ist auf Anfrage von Novo Nordisk A/S, Dänemark erhältlich, wobei das Faltblatt hier unter Bezugnahme eingebracht ist.

Das Enzym

[0023] Das Enzym der Erfindung ist eine neue Detergensprotease. Ist es eine alkalische Protease, die durch Züchten eines Mikroorganismus der Erfindung, vorzugsweise von Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338 oder eines Mutanten oder einer Variante davon in einem geeigneten Nährstoffmedium, enthaltend Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze, erhältlich ist. Das Enzym kann auch durch rekombinante DNA-Technologie erhalten werden.

[0024] Die Protease der Erfindung kann durch die folgenden Eigenschaften beschrieben werden.

Physikalisch-chemische Eigenschaften

[0025] Ein durch SDS-PAGE bestimmtes Molekulargewicht von 28 kD. Ein pI über 9,5 konnte durch isoelektrisches Fokussieren auf LKB-Ampholine®-PA-Platten nicht genau bestimmt werden. Die Proteaseaktivität wird durch PMSF, α-1-Antitrypsin und Truthahneiweißproteinasehemmer gehemmt. EDTA und Sojabohnenproteinhemmer beeinflussen die Proteaseaktivität nicht.

[0026] Die Temperaturaktivitätsbeziehung wurde mit 2% Casein als Substrat und bei pH 9,5 in Gegenwart (weiße Quadrate) und in Abwesenheit (schwarze Quadrate) von 0,1% Natriumtripolyphosphat (STPP, ein üblicher Inhaltsstoff in vielen kommerziellen Detergenzien) bestimmt. Der vorstehend beschriebene Test auf proteolytische Aktivität wurde mit der Modifikation verwendet, dass die Inkubationstemperatur im Intervall von 15 bis 70°C variierte.

[0027] Das Ergebnis ist in Fig. 1 dargestellt. Es scheint aus der Figur, dass das Enzym bei Temperaturen von unter 15°C bis über 70°C proteolytische Aktivität besitzt und ein Temperaturoptimum im Bereich von 45 bis 55°C, um 50°C aufweist.

[0028] Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert wurde durch dasselbe Verfahren unter Verwendung von Puffern bestimmt, die auf vorbestimmte pH-Werte im pH-Bereich von 6–11 eingestellt waren.

[0029] Das Ergebnis ist in Fig. 2 dargestellt, es scheint aus dieser Figur, dass das Enzym bei pH-Werten unter 6 bis über 11 mit einem pH-Optimum über pH 10, insbesondere mit einem pH-Optimum von mindestens 11 proteolytische Aktivität besitzt.

[0030] Weiterhin wurde gefunden, dass die Protease der Erfindung für eine Dauer von 60 Minuten bei 25°C unter Waschbedingungen in europäischen und amerikanischen Detergenzien stabil ist.

[0031] Die Protease der Erfindung besitzt spezielle Potentiale in Detergenzien mit hoher Ionenstärke und hohem pH-Wert. Aus dem Waschleistungstest, vgl. Beispiel 2, während der Wäsche bei pH 11 in Wasser mit 9°DH (Deutsche Härte) fand eine Waschleistung statt, die derjenigen der alkalischen Bacillusprotease SAVINASE™ (Novo Nordisk A/S, Dänemark) weit überlegen war.

Immunochemische Eigenschaften

[0032] Die Protease der Erfindung weist immunochemische Eigenschaften auf, die mit denjenigen einer vom Stamm PD138, NCIMB 40338 von Bacillus sp. abgeleiteten Protease identisch oder teilweise identisch (d.h. zumindest teilweise identisch) sind.

[0033] Die immunochemischen Eigenschaften können immunologisch durch Kreuzreaktionsidentitätstests bestimmt werden. Die Identitätstests können durch das bekannte Ouchterlony-Doppelimmunodiffusionsver-

fahren oder durch doppelgekreuzte Immunoelektrophorese N. H. Axelsen; Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques; Blackwell Scientific Publications (1983), Kapitel 5 und 14 durchgeführt werden. Die Begriffe „antigene Identität" und „teilantigene Identität" sind in demselben Buch, Kapitel 5, 19 und 20 beschrieben.

[0034] Monospezifisches Antiserum wurde gemäß den vorstehend erwähnten Verfahren durch Immunisieren von Kaninchen mit der gereinigten Protease der Erfindung gebildet. Das Immunogen wurde mit Freund-Hilfsstoff gemischt und subkutan alle zwei Wochen in Kaninchen injiziert. Antiserum wurde nach einer Gesamtimmunisierungsdauer von 8 Wochen erhalten, und Immunglobulin wurde daraus wie beschrieben von N. H. Axelsen, vorstehend, hergestellt.

[0035] Ouchterlony-Doubleimmunodiffusionstests zeigten keine Kreuzreaktion zwischen der Protease der Erfindung und den bekannten alkalischen Serinproteasen ALCALASE™, SAVINASETM, ESPERASE™ Subtilisin Novo (erhältlich von Novo Nordisk A/S), und KAZUSASE™ (erhältlich von SHOWA DENKO).

Detergenszusammensetzungen

[0036] Erfindungsgemäß kann die Protease typischerweise als Bestandteil einer Detergenszusammensetzung zugesetzt werden. Als solche kann sie in der Detergenszusammensetzung in Form eines Detergenszusatzes eingeschlossen sein. Die Detergenszusammensetzung sowie der Detergenszusatz können zusätzlich ein oder mehrere andere herkömmlich in Detergenzien verwendete Enzyme wie Lipasen, Amylasen, Cellulasen, Oxidasen oder Peroxidasen umfassen.

[0037] In einem spezifischen Aspekt stellt die Erfindung ein Detergenszusatz bereit. Die Enzyme können durch Zugabe von einzelnen ein oder mehrere Enzyme enthaltenden Zusätzen oder durch Zugabe eines kombinierten alle dieser Enzyme umfassenden Zusatzes in eine Detergenszusammensetzung eingeschlossen werden.

[0038] Vorzugsweise ist der Detergenszusatz, d.h. ein einzelner Zusatz oder ein kombinierter Zusatz in Form eines Granulats, vorzugsweise eines nicht stäubenden Granulats, einer Flüssigkeit, insbesondere einer stabilisierten Flüssigkeit, einer Aufschlämmung oder in einer geschützten Form bereitgestellt.

[0039] Staubfreie Granulate können z.B. wie in US 4,106,991 und US 4,661,452 (beide an Novo Industri A/S) offenbart hergestellt und wahlweise durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren beschichtet werden. Die Detergensenzyme können vor oder nach der Granulierung gemischt werden.

[0040] Flüssige Enzympräparate können z.B. durch Zugabe eines Polyols wie von Polypropylenglycol, eines Zuckers oder Zuckeralkohols, von Milchsäure oder Borsäure gemäß etablierten Verfahren stabilisiert werden. Andere Enzymstabilisatoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

[0041] Geschützte Enzyme können gemäß dem in EP 238,216 A offenbarten Verfahren hergestellt werden.

[0042] Die Detergenszusammensetzung der Erfindung kann in jeder beliebigen günstigen Form, z.B. als Pulver, Granulat oder Flüssigkeit vorliegen. Ein flüssiges Detergens kann wässrig sein, wobei es typischerweise bis zu 90% Wasser und 0–20% organisches Lösungsmittel enthält. Die Detergenszusammensetzung umfasst ein oberflächenaktives Mittel, das anionisch, nicht-ionisch, kationisch, amphoter oder ein Gemisch dieser Typen sein kann. Das Detergens enthält gewöhnlich 0–50% anionisches oberflächenaktives Mittel wie lineares Alkylbenzolsulfonat (LAS), alpha-Olefinsulfonat (AOS), Alkylsulfat (AS), Alkoholethoxysulfat (AES) oder Seife. Es kann auch 0–40% nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel wie Nonylphenolethoxylat oder Alkoholethoxylat enthalten. Des Weiteren kann es ein oberflächenaktives Polyhydroxyfettsäureamid (z.B. wie beschrieben WO 92/06154) enthalten.

[0043] Der pH-Wert (gemessen in wässriger Detergenslösung) ist gewöhnlich neutral oder alkalisch, z.B. 7–11. Das Detergens kann 1–40% eines Detergensgerüststoffs wie Zeolith, Phosphat, Phosphonat, Citrat, NTA, EDTA oder DTPA, Alkenylbernsteinsäureanhydrid oder Silicat enthalten oder ohne Gerüststoff vorliegen (d.h. im Wesentlichen frei von einem Gerüststoff sein). Es kann auch andere herkömmliche Detergensinhaltsstoffe, z.B. Gewebeweichmacher, Schaumverstärker, Bleichmittel, z.B. Perborat, Tetraacetylethylendiamin (TAED) oder Nonanoyloxybenzolsulfonat (NOBS), Antikorrosionsmittel, Schmutzsuspensionsmittel, Maskierungsmittel, Mittel gegen die Wiederablagerung von Schmutz, Stabilisatoren für das (die) Enzym(e), Schaumunterdrücker, Farbstoffe, Bakterizide, optische Aufheller oder Parfüms enthalten.

[0044] Bestimmte Formen der Detergenszusammensetzung im Umfang der Erfindung schließen ein:

a) Eine Detergenszusammensetzung, formuliert als Detergenspulver, enthaltend Phosphatgerüststoff anionisches oberflächenaktives Mittel, nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, Silicat, Alkali zum Einstellen auf den gewünschten pH-Wert bei Verwendung und neutrales anorganisches Salz.

b) Eine Detergenszusammensetzung, formuliert als Detergenspulver, umfassend Zeolith, Gerüststoff anionisches oberflächenaktives Mittel, nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, Acryl oder ein gleichwertiges Polymer, Silicat, Alkali zum Einstellen auf den gewünschten pH-Wert bei Verwendung und neutrales anorganisches Salz.

c) Eine Detergenszusammensetzung, formuliert als wässrige Detergensflüssigkeit, umfassend anionisches oberflächenaktives Mittel, nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, Netzmittel, organische Säure, Atzalkali mit einem auf einen Wert zwischen 7 und 10,5 eingestellten pH-Wert bei Verwendung.

d) Eine Detergenszusammensetzung, formuliert als nicht wässrige Detergensflüssigkeit, unfassend ein flüssiges nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, das im Wesentlichen aus linearem alkoxyliertem primärem Alkohol, Phosphatgerüststoff Ätzalkali besteht, mit einem auf einen Wert zwischen etwa 7 und 10,5 eingestellten pH-Wert bei Verwendung.

e) Eine Detergenszusammensetzung, formuliert als Detergenspulver in Form eines Granulats mit einer Schüttdichte von mindestens 600 g/l, enthaltend anionisches oberflächenaktives Mittel und nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, wenig oder im Wesentlichen kein neutrales anorganisches Salz, Phosphatgerüststoff und Natriumsilicat.

f) Eine Detergenszusammensetzung, formuliert als Detergenspulver in Form eines Granulats mit einer Schüttdichte von mindestens 600 g/l, enthaltend anionisches oberflächenaktives Mittel und nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, geringe oder im Wesentlichen kein neutrales anorganisches Salz, Zeolithgerüststoff und Natriumsilicat.

g) Eine Detergenszusammensetzung, formuliert als Detergenspulver, enthaltend anionisches oberflächenaktives Mittel, nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, Acrylpolymer, Fettsäureseife, Natriumcarbonat, Natriumsulfat, Tonteilchen und Natruimsilicat.

h) Ein flüssiges Kompaktdetergens, umfassend 5–65 Gew.-% oberflächenaktives Mittel, 0–50 Gew.-% Gerüststoff und 0–30 Gew.-% Elektrolyt.

[0045] Es wird gegenwärtig erwogen, dass die Protease in der Detergenszusammensetzung der Erfindung in einer Menge, entsprechend 0,001–100 ml Enzym pro Liter Waschlauge, zugesetzt werden kann.

[0046] Die Erfindung wird des Weiteren in den folgenden Beispielen veranschaulicht, die den wie beanspruchten Umfang der Erfindung in keinster Weise einschränken sollen.

BEISPIEL 1

[0047] Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338 wurde bei 25°C auf einem Drehschütteltisch (300 UpM) in Scheideerlenmeyerkolben mit einem Volumen von 500 ml, enthaltend 100 ml Medium der folgenden Zusammensetzung (pro Liter), gezüchtet:

Kartoffelstärke	100 g
Gemahlene Gerste	50 g
Sojabohnenmehl	20 g
$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	9 g
Pluronic®	0,1 g
Natriumcaseinat	10 g

[0048] Die Stärke im Medium wird mit α-Amylase verflüssigt und das Medium durch Erwärmen bei 120°C für eine Dauer von 45 Minuten sterilisiert.

[0049] Nach der Sterilisation wird der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von 10 ml 1 M Natriumbicarbonatlösung auf 9,0 eingestellt.

[0050] Nach 4-tägiger Inkubation wurde die proteolytische Aktivität der Kultur unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren bestimmt.

[0051] Nach dem Züchten betrug die enzymatische Aktivität der Brühe 20 CPU/l.

[0052] Nach der Abtrennung des festen Materials wurde die Protease durch ein herkömmliches chromatogra-

phisches Verfahren gereinigt.

[0053] Die Ausbeute von 1 Liter Kulturbrühe betrug 50 ml mit 100 CPU/l. Die wie durch SDS-PAGE bewertete Reinheit betrug mehr als 90%.

[0054] Die Eigenschaften des gemäß diesem Beispiel hergestellten Präparats wurden früher in dieser Patentanmeldung genannt, und es wird darauf Bezug genommen.

BEISPIEL 2

Waschleistung

[0055] Der Waschleistungstest wurde auf mit Gras verschmutzter Baumwolle bei 40°C isothermisch für eine Dauer von 10 Minuten erzielt.

[0056] Die Tests wurden bei Enzymkonzentrationen von 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 und 1,0 mg Enzymprotein pro Liter durchgeführt.

[0057] 5,0 g/l eines im Handel erhältlichen europäischen Kompaktpulverdetergenzes wurden verwendet. Das Detergens wurde in Wasser mit etwa 9°dH (deutsche Härte) gelöst und der pH-Wert auf 11 eingestellt. Das Textil/Waschlaugenverhältnis betrug 6 g Textil pro Liter Waschlauge.

[0058] Nach dem Waschen wurden die Stoffe in fließendem Leitungswasser gespült und luftgetrocknet. Die Remission (%R) bei 460 nm wurde bestimmt.

[0059] Als Maß der Waschleistung wurde die Differenzialremission δR verwendet, die gleich der Remission nach dem Waschen mit zugesetztem Enzym minus der Remission nach dem Waschen ohne zugesetztes Enzym war.

[0060] Die Ergebnisse dieser Tests sind in nachstehender Tabelle 1 dargestellt (Mittelwerte aus zwei Tests).

Tabelle 1

Enzymkonzentration	delta R	
(mg Enzymprotein/Liter)	PD138	SAVINASE™
0,01	5,7	3,2
0,025	13,5	-
0,05	19,4	8,1
0,10	22,0	14,8
0,50	22,6	22,0
1,0	-	22,2

(- nicht durchgeführt)

[0061] Die Differenzialremissionswerte zeigen, dass die Protease der Erfindung besondere Potentiale in Detergenzien mit hoher Ionenstärke und hohem pH-Wert aufweist, wobei sie gute Waschfähigkeit besitzt.

ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEN MIKROORGANISMUS ODER ANDEREM BIOLOGISCHEN MATERIAL

(Regel 13*bis* PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den hinterlegten Mikroorganismus oder anderes biologisches Material, das in der Beschreibung genannt ist auf Seite 1 Zeile 3

B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet ☒

Name der Hinterlegungsstelle

NATIONAL COLLECTIONS OF INDUSTRIAL & MARINE BACTERIA LTD.

Anschrift der Hinterlegungsstelle *(einschließlich Postleitzahl und Land)*

23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Schottland

Datum der Hinterlegung	Eingangsnummer
3. Dezember 1990	NCIMB 40338

C. WEITERE ANGABEN *(falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)* Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt ☐

In Bezug auf diejenigen Vertragsstaaten, in welchen ein Europäisches Patent angestrebt wird, ist eine Probe des hinterlegten Mikroorganismus nur durch die Herausgabe einer derartigen Probe an einen Fachmann, der von der die Probe anfordernden Person benannt wurde, (Regel 28(4) EPC), bis zur Veröffentlichung des Hinweises auf die Erteilung des Europäischen Patents, oder bis zu dem Tag, an dem die Anmeldung zurückgewiesen wird oder als zurückgenommen gilt, verfügbar.

D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN
(falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)

E. NACHREICHUNG VON ANGABEN *(falls nicht zutreffend, bitte freilassen)*

Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z.B. *„Eingangsnummer der Hinterlegung")*

Vom Anmeldeamt auszufüllen	Vom Internationalen Büro auszufüllen
☐ Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung	☐ Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter	Bevollmächtigter Bediensteter

Formblatt PCT/RO/134 (Juli 1998; Nachdruck Januar 2004)

Patentansprüche

1. Protease, gekennzeichnet durch die folgenden Eigenschaften:
(a) ein scheinbares Molekulargewicht, wie bestimmt durch SDS-Page, von 28 kD,
(b) einen pI-Wert über 9,5,
(c) ein pH-Optimum über einem pH-Wert von 10 (bei 25°C und mit Casein als Substrat),
(d) ein Temperaturoptimum im Bereich von 45 bis 55°C (bei einem pH-Wert von 9,5 und mit Casein als Substrat),
(e) immunochemische Eigenschaften, die mit denjenigen einer vom Stamm PD138, NCIMB40338 von Bacillus sp. erhältlichen Protease identisch sind.

2. Protease nach Anspruch 1, erhältlich vom Stamm PD138, NCIMB40338 von Bacillus sp.

3. Isolierte biologisch reine Kultur des Stamms PD138, NCIMB40338 von Bacillus sp.

4. Verfahren zur Herstellung einer Protease nach einem der Ansprüche 1–2, wobei das Verfahren das Züchten eines Protease-erzeugenden Stamms von Bacillus sp. nach Anspruch 3 in einem geeigneten Nährstoffmedium, enthaltend Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze, gefolgt von der Gewinnung des gewünschten Enzyms umfasst.

5. Verwendung einer Protease nach einem der Ansprüche 1–2 als Detergenzenzym.

6. Detergenzzusammensetzung, umfassend eine Protease nach einem der Ansprüche 1–2.

7. Detergenzzusammensetzung nach Anspruch 6, die des Weiteren ein oder mehrere andere(s) Enzym(e), insbesondere eine Amylase, eine Lipase, eine Cellulase, eine Peroxidase und eine Oxidase umfasst.

8. Detergenzzusatz, umfassend eine Protease nach einem der Ansprüche 1–2, bereitgestellt in Form eines nicht-stäubenden Granulats, einer Flüssigkeit, insbesondere einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms.

9. Waschverfahren, umfassend die Zugabe einer Protease nach einem der Ansprüche 1–2.

10. Waschverfahren nach Anspruch 9, umfassend die Zugabe einer Detergenzzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6–7.

11. Waschverfahren nach Anspruch 9, umfassend die Zugabe eines Detergenzzusatzes nach Anspruch 8.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

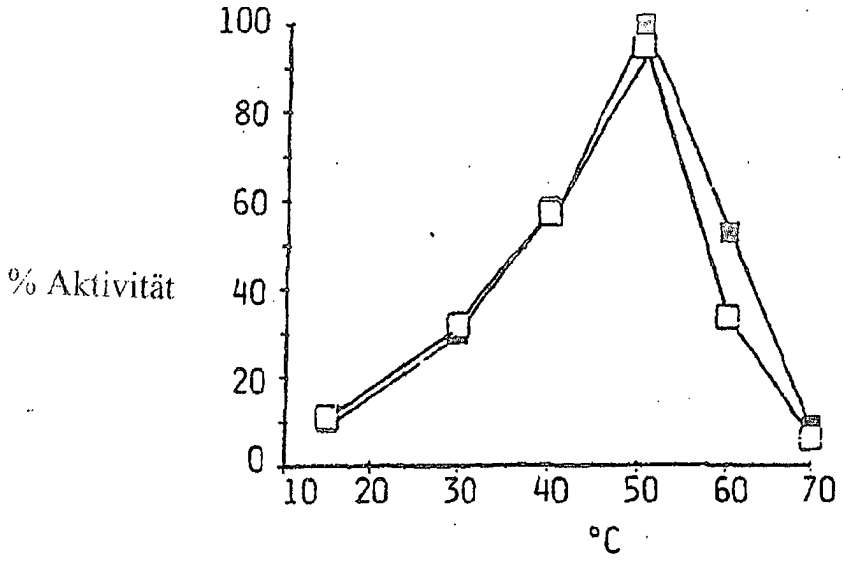


Fig. 1

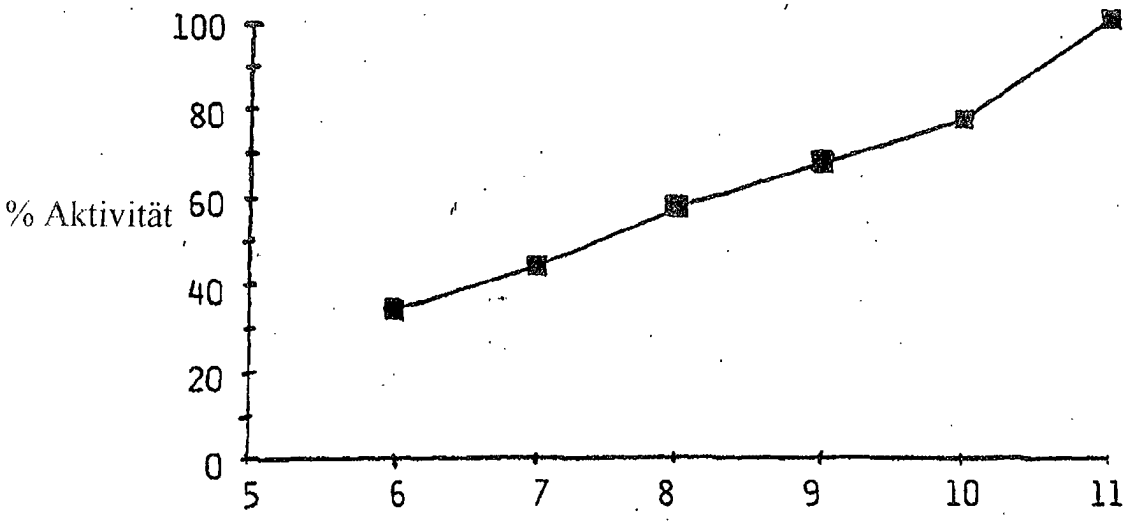


Fig. 2