(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 944033 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 944033

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 9/54 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **03.03.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.09.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.09.1994**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **03.03.1993 PCT/DK1993/000074**

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

04.03.1992 DK 287/92 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Novozymes A/S,** Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Outtrup, Helle,** Ballerup, TANSKA, (DK)
2 •**Dambmann, Claus,** Soeborg, TANSKA, (DK)
3 •**Aaslyng, Dorrit Anita,** Roskilde, TANSKA, (DK)
4 •**Lindegaard, Poul,** Koebenhavn, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Uusia proteaaseja
Ny proteaser

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

40338 NCIMB

Uusia Bacillus-proteaaseja - Nya Bacillus-proteaser

Tämä keksintö kuuluu Bacillus sp. -kannoista johdettujen pesuaineproteaasien alaan. Erityisemmin keksintö kohdistuu Bacillus sp. -kannasta PD138 johdettuun uuteen alkaliseen proteaasiin. Lisäksi keksintö kohdistuu menetelmään proteaasin valmistamiseksi, proteaasin käyttöön pesuaineen entsyyminä ja keksinnön mukaista proteaasia käsittäviin pesuainekoostumuksiin.

Pesuaineen entsyymeitä on markkinoitu yli 20 vuotta ja ne ovat nykyisin hyvin vakiintuneita normaaleina pesuaineen aineosina sekä jauhemaisissa että nestemäisissä pesuaineissa kaikkialla maailmassa. Trendin kohdistuessa alhaisessa lämpötilassa pesemiseen pesuaineen entsyymikulutus on lisääntynyt viime vuosina. Pesuformuloinnessa käytetyt entsyymit käsittävät proteaasit, lipaasit, amylaasit, sellulaasit sekä muut entsyymit ja näiden sekoitukset. Kaupallisesti tärkeimpiä ovat proteaasit.

Pesuaineproteaaseja on kehitetty eristämällä luonnosta löydettyjä proteaaseja, mitä on seurannut testaaminen pesuaineformuloinneissa. Useimmat pesuaineproteaasit saadaan suvun Bacillus jäsenistä. Nykyisin tulee markkinoille uusia proteaasityyppejä, jotka tarjovat mahdollisuuksia saada parempi hinta/tehosuhde erilaisissa spesifisissä olosuhteissa.

Esimerkkejä kaupallisista proteaasituotteista ovat ALCALASE™, ESPERASE™ ja SAVINASE™, joita kaikkia toimittaa Novo Nordisk A/S, Tanska. Nämä ja muista kaupallisista lähteistä peräisin olevat entsyymituotteet ovat aktiivisia pesuaineliuoksissa, so. pH-arvoissa alueella 8-11 ja sekvestrausaineiden, pinta-aktiivisten aineiden ja valkaisuaineiden, kuten natriumboraatin, läsnäollessa. ALCALASE™-proteaasia tuottavat Bacillus licheniformis -lajin kannat. ESPERASE™:ä ja SAVINASE™:ä saadaan viljelemällä alkalofiilisten Bacillusten kantoja.

Esillä olevan keksinnön kohteena on saada aikaan uusia pesuaineproteaaseja, joiden pesuteho on parantunut korkeassa pH:ssa ja suuressa ionivahvuudessa.

Näin ollen ensimmäisessä kohteessaan keksintö saa aikaan proteaasin, jonka näennäismolekyylipaino on 28 kD, pI yli 9,5, pH-optimi pH:ssa 11 tai sen yli (25 °C:ssa), lämpötilaoptimi alueella 45-55 °C (pH:ssa 9,5) ja immunokemialliset ominaisuudet identtiset kannasta Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338 johdetun proteaasin immunokemiallisten ominaisuuksien kanssa.

Toisessa kohteessa keksintö kohdistuu eristettyyn biologisesti puhtaaseen viljelmään kannasta Bacillus sp, jota edustaa Bacillus sp. PD138. Erityisemmässä kohteessaan keksintö kohdistuu Bacillus sp. PD138:n, NCIMB 40338, kantaan.

Kolmannessa kohteessa keksintö saa aikaan menetelmän proteaasin valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää Bacillus sp. proteaasia tuottavan kannan viljelemisen sopivassa ravintoväliaineessa, joka sisältää hiili- ja typpilähteitä ja ei-orgaanisia suoloja, mitä seuraa halutun entsyymin talteenotto. Erityisemmässä kohteessa viljellään Bacillus sp. isäntäorganismia, jossa on geeni, joka koodaa proteaasia, jossa on immunokemialliset ominaisuudet, jotka ovat identtiset Bacillus sp. PD138:sta johdetun proteaasin ominaisuuksien kanssa.

Neljännessä kohteessa haetaan patenttia entsyymin käytölle pesuaineen entsyyminä. Erityisemmissä spesifisissä kohteissa keksintö saa aikaan pesuainekoostumuksia ja pesuaineen lisäaineita.

Viidennessä kohteessa keksintö saa aikaan pesumenetelmän, joka käsittää proteaasin lisäämisen.

Täsmällisemmin sanottuna keksinnön kohde on määritelty oheisissa patenttivaatimuksissa.

Esillä olevaa keksintöä valaistaan lisäksi viittaamalla oheisiin piirustuksiin, joissa:

Kuvio 1 esittää lämpötilan ja keksinnön mukaisen entsyymin proteolyytisen aktiivisuuden välistä suhdetta (entsyymivalmiste on saatu esimerkin 1 mukaisesti, 2 % kaseiinia substraattina ja pH:ssa 9,5; ■ puskuri, □ puskuri + 0,1 % STPP).

Kuvio 2 esittää pH:n ja keksinnön mukaisen entsyymin proteolyyttisen aktiivisuuden välistä suhdetta (entsyymivalmiste on saatu esimerkin 1 mukaisesti, 12 % kaseiinia substraattina ja 25 °C:ssa).

Mikro-organismi

Keksinnön mukainen uusi mikro-organismi, joka kykenee tuottamaan keksinnön mukaisen entsyymin, on kantaa, joka eristettiin jamaikalaisesta maaperästä. Bacillus sp. PD138 on talletettu Budapestin sopimuksen mikro-organismien talletuksen kansainvälisen tunnistamisen patenttimenettelytarkoituksiin mukaisesti 3. joulukuuta 1990 National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd:hen, (NCIMB) 23. St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Skotlanti, UK, talletusnumerolla NCIMB 40338.

Tämän keksinnön mukainen mikro-organismi on aerobinen, itiöitä muodostava bakteeri, joka kuuluu sukuun Bacillus. Morfologisesti se voidaan kuvata liikkuviksi tangoiksi, joiden halkaisija on 0,7-0,9 mikronia ja pituus 2-3 mikronia. Itiöt ovat pyöreistä ellipsin muotoisiin, itiöpesäke ei turpoa, keskeisistä subterminaalisiin. Kasvun optimilämpötila on 25-37 °C ja optimaalinen kasvun pH on 7-9, ei kasvua pH:ssa 9,5 eikä kasvua 50 °C:ssa. Mikro-organismi muodostaa kellertävistä keltaisiin pesäkkeitä, pyöreitä ja pehmeitä, ravintoaine-agar-viisteille eikä mitään pigmentin diffuusiota havaita.

Mikro-organismin viljeleminen

Keksinnön mukaista mikro-organismia voidaan viljellä aerobisissa olosuhteissa väliaineessa, joka sisältää assimiloituvaa hiiltä ja typpeä yhdessä muiden oleellisten ravintoaineiden kanssa väliaineen ollessa koostettu tunnetun tason periaatteiden mukaisesti.

Sopivia hiililähteitä ovat hiilihydraatit, kuten sakkaroosi, glukoosi ja tärkkelys, tai hiilihydraattia sisältävät materiaalit, kuten viljanjyvät, mallas, riisi ja durra. Väliaineeseen sisällytetty hiilihydraattikonsentraatio voi vaihdella laajasti, esim. 25 % saakka ja 1-5 %:iin, mutta tavallisesti 8-10 % on sopivaa, prosenttien ollessa laskettu glukoosin ekvivalentteina.

Väliaineessa oleva typpilähde voi olla luonteeltaan ei-orgaanista ja/tai orgaanista. Sopivia ei-orgaanisia typpilähteitä ovat nitraatit ja ammoniumsuolat. Orgaanisista typpilähteistä suurta määrää käytetään säännöllisesti fermointiprosesseissa, joihin sisältyy bakteerien viljeleminen. Valaisevia esimerkkejä ovat soijajauho, puuvillasiemenjauho, pähkinäjauho, kaseiini, maissi, maissin liuotusneste, hiivauute, urea ja albumiini. Lisäksi ravintoväliaineen tulee sisältää myös tavallisia hivenaineita.

Keksinnön mukainen uusi Bacillus-laji on hieman alkalofiilinen. Siten viljely suoritetaan hieman alkalisissa pH-arvoissa, jotka voidaan saada lisäämällä sopivia puskureita, kuten natriumbikarbonaattia, pH 9,0, kasvuväliaineen steriloinnin jälkeen. Säiliöfermenttoreissa viljelemisen osalta on tarpeellista käyttää keinotekoista ilmastusta. Ilmastuksen määrä on samanlainen kuin konventionaalisessa säiliöfermentaatiossa käytetty.

Fermennoinnin jälkeen nestemäiset entsyymikonsentraatit voidaan valmistaa poistamalla raakamateriaali liemestä tai haluttaessa konsentroimalla liemi haihduttamalla alhaisessa lämpötilassa tai käänteisosmoosilla. Lopuksi konsentraattiin voidaan lisätä säilöntäaineita.

Kiinteät entsyymivalmisteet voidaan valmistaa puhdistetusta ja/tai konsentroidusta liemestä saostamalla suoloilla, kuten Na_2SO_4, tai veteen sekoittuvilla liuottimilla, kuten etanoli tai asetoni. Voidaan käyttää myös veden poistamista liemestä sopivilla kuivausmenetelmillä, kuten spraykuivaamalla.

Proteolyyttisen aktiivisuuden testi

Proteolyyttinen aktiivisuus määritetään kaseiinilla substraattina. Yksi kaseiiniproteaasiyksikkö (CPU) määritetään entsyymin määräksi, joka vapauttaa 1 mM primaarisia aminoryhmiä (määritetty vertaamalla seriinistandardiin) minuutissa standardiolosuhteissa. so. inkubointi 30 minuuttia 25 °C:ssa ja pH:ssa 9,5.

Kansio AF 228, jossa kuvataan analyyttinen metodi, on saatavissa pyynnöstä Novo Nordisk A/S:stä, Tanska, joka kansio sisällytetään tähän viitteeksi.

Entsyymi

Keksinnön mukainen entsyymi on uusi pesuaineproteaasi. Se on alkalinen proteaasi, joka on saatavissa viljelemällä keksinnön mukaista mikro-organismia, edullisesti Bacillus sp. PD138:aa, NCIMB 40338, tai sen mutanttia tai varianttia sopivassa viljelyväliaineessa, joka sisältää hiili- ja typpilähteitä ja eiorgaanisia suoloja. Entsyymi voidaan saada myös yhdistelmä-DNA-tekniikalla.

Keksinnön mukaista proteaasia voidaan kuvata seuraavilla piirteillä.

Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

Molekyylipaino 28 kD määritettynä SDS-PAGElla. Yli 9,5 pI:tä ei voida määrittää tarkasti isoelektrisellä fokusoinnilla LKB Ampholinen® PAG-levyillä. Proteaasiaktiivisuus inhiboidaan PMSF-, alfa-1-antitrypsiini- ja kalkkunan munanvalkuaisproteinaasi-inhibiittorilla. EDTA ja soijapapuproteiini-inhibiittori eivät vaikuta proteaasiaktiivisuuteen.

Lämpötila-aktiivisuussuhde määritettiin 2 %:illa kaseiinia substraattina ja pH:ssa 9,5 0,1 %:n natriumtripolyfosfaattia (STPP, yleinen aineosa monissa kaupallisissa pesuaineissa) läsnäollessa (valkoiset neliöt) ja puuttuessa (mustat neliöt). Aiemmin kuvattua proteolyyttisen aktiivisuuden testaamista

käytettiin siten modifioiden, että inkubointilämpötila vaihteli välillä 15-70 °C.

Tulos on esitetty kuviossa 1. Kuviosta ilmenee, että entsyymillä on proteolyyttistä aktiivisuutta lämpötiloissa alle 15 °C:sta noin 70 °C:een ja sen lämpötilaoptimi on alueella 45-55 °C, noin 50 °C.

Aktiivisuuden riippuvuus pH:sta määritettiin samalla menetelmällä käyttäen puskureita, jotka on säädetty ennalta määrättyihin pH-arvoihin pH-alueella 6-11.

Tulos on esitetty kuviossa 2. Tästä kuviosta ilmenee, että entsyymillä on proteolyyttistä aktiivisuutta pH-arvoissa alle 6:sta yli 11:een, pH-optimin ollessa yli 10, erityisemmin pH-optimissa vähintään 11.

Lisäksi havaittiin, että keksinnön mukainen proteaasi on vakaa 60 minuuttia 25 °C:ssa pesuolosuhteissa eurooppalaistyyppisissä ja amerikkalaistyyppisissä pesuaineissa.

Keksinnön mukaisella proteaasilla on erityisiä potentiaaleja pesuaineissa suurilla ionivahvuuksilla ja korkealla pH:lla. Pesutehotestistä, vrt. esimerkki 2, pesun aikana pH:ssa 11 9° dH:n (saksalainen kovuus) vedessä, pesuteho oli parempi kuin alkalisen Bacillusproteaasin SAVINASE™ (Novo Nordisk A/S, Tanska).

Immunokemialliset ominaisuudet

Keksinnön mukaisella proteaasilla on immunokemialliset ominaisuudet, jotka ovat identtiset tai osittain identtiset (so. vähintään osittain identtiset) kannasta Bacillus sp. PD138, NCIMB 40388, johdetun proteaasin ominaisuuksien kanssa.

Immunokemialliset ominaisuudet voidaan määrittää immunologisesti ristireaktioidenttisyystesteillä. Identtisyystestit voidaan suorittaa hyvin tunnetulla Ouchterlony-kaksoisimmunodiffuusiomenetelmällä tai satunnaisristiöidyllä immunoelektroforeesilla N.H Axelsenin mukaisesti, Handbook of Immunoprecipi-

tation-in-Gel Techniques, Blackwell Scientific Publications (1983), kappaleet 5 ja 14. Termit "antigeeninen identtisyys" ja "osittainen identtisyys" on kuvattu samassa kirjassa, kappaleissa 5, 19 ja 20.

Monospesifinen antiseerumi generoitiin edellä mainitun menetelmän mukaisesti immunisoimalla kanit keksinnön mukaisella puhdistetulla proteaasilla. Immunogeeni sekoitettiin Freundin adjuvanttiin ja injektoitiin subkutaanisesti kaneihin joka toinen viikko. Antiseerumi saatiin 8 viikon kokonaisimmunisoinnin jälkeen ja immunoglobuliini valmistettiin siitä N.H. Axelsenin, supra, mukaisesti. Ouchterlony-kaksoisimmunodiffuusiotestit eivät osoittaneet mitään ristireagointia keksinnön mukaisen proteaasin ja tunnettujen alkalisten seriiniproteaasin ALCALASE™, SAVINASE™, ESPERASE™, subtilisin Novon (saatavissa Novo Nordisk A/S:stä) ja KAZUSASE™ (saatavissa SHOWA DENKOsta) välillä.

Pesuainekoostumukset

Keksinnön mukaisesti proteaasia voidaan lisätä tyypillisesti pesuainekoostumuksen komponenttina. Se voidaan sisällyttää sellaisenaan pesuainekoostumukseen pesuainelisäaineen muodossa. Pesuainekoostumus sekä pesuainelisäaine voivat käsittää lisäksi yhtä tai useampaa pesuaineissa konventionaalisesti käytettyä muuta entsyymiä, kuten lipaaseja, amylaaseja, sellulaaseja, oksidaaseja tai peroksidaaseja.

Spesifisessä kohteessa keksintö saa aikaan pesuainelisäaineen. Entsyymit voidaan sisällyttää pesuainekoostumukseen lisäämällä erillisiä lisäaineita, jotka sisältävät yhtä tai useampaa entsyymiä tai lisäämällä yhdistettyä lisäainetta, joka käsittää kaikki nämä entsyymit.

Edullisesti pesuaineen lisäaine, so. erillinen lisäaine tai yhdistetty lisäaine, varustetaan granulaatin, edullisesti pölyämättömän granulaatin, nesteen, erityisesti stabiloidun nesteen, lietteen muodossa tai suojatussa muodossa.

Pölyttömät granulaatit voidaan valmistaa esimerkiksi kuten US-4 106 991:ssä ja US-4 661 452:ssa (molemmat Novo Industri A/S:n) kuvataan ja ne voidaan päällystää optionaalisesti alalla tunnetuilla menetelmillä. Pesuaineen entsyymit voidaan sekoittaa ennen tai jälkeen granuloinnin,

Nestemäiset entsyymivalmisteet voidaan stabiloida esimerkiksi lisäämällä polyolia, kuten propyleeniglykolia, sokeria tai sokerialkoholia, maitohappoa tai boorihappoa, vakiintumeiden menetelmien mukaisesti. Muut entsyymin stabiloijat ovat hyvin tunnettuja alalla.

Suojatut entsyymit voidaan valmistaa EP-238 216 A:ssa selostetun menetelmän mukaisesti.

Keksinnön mukainen pesuainekoostumus voi olla missä tahansa tavanmukaisessa muodossa, esim. jauheena, granuloina tai nesteenä. Nestemäinen pesuaine voi olla vesipitoista, sisältää tyypillisesti korkeintaan 90 % vettä ja 0-20 % orgaanista liuotinta.

Pesuainekoostumus käsittää pinta-aktiivista ainetta, joka voi olla anionista, ei-ionista, kationista, amfoteeristä tai näiden tyyppien seosta. Pesuaine sisältää tavallisesti 0-50 % anionista pinta-aktiivista ainetta, kuten lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia (LAS), alfa-olefiinisulfonaattia (AOS), alkyylisulfaattia (AS), alkoholietoksisulfaattia (AES) tai saippuaa. Se voi sisältää myös 0-40 % ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, kuten nonyylifenolietoksylaattia tai alkoholietoksylaattia. Lisäksi se voi sisältää polyhydroksirasvahappoamidipinta-aktiivista ainetta (esim. WO 92/06154:ssä kuvattua).

pH (mitattuna vesipitoisessa pesuainekoostumuksessa) on tavallisesti neutraali tai alkalinen, esim. 7-11. Pesuaine voi sisältää 1-40 % pesuainerakenneainetta, kuten zeoliittia, fosfaattia, fosfonaattia, sitraattia, NTA, EDTA tai DTPA, alkenyylisukkiinianhydridiä tai silikaattia tai se voi olla rakenneaineeton (oleellisesti vapaata pesuainerakenneaineesta). Se

voi sisältää myös muita konventionaalisia pesuaineen aineosia, esim. kuitujen hoitoainetta, vaahtoamisen tehostajia, valkaisuaineita, esim. perboraattia, perkarbonaattia, tetra-asetyylietyleenidiamiinia (TAED) tai nonanoyylioksibentseenisulfonaattia (NOBS), korroosionestoaineita, likaa suspendoivia aineita, sekvestrausaineita, lian uudelleenkerrostumisen estoaineita, entsyymi(e)n stabilointiaineita, vaahtoamisen depressoreita, väriaineita, bakteereita tappavia aineita, optisia kirkasteita tai parfyymejä.

Erityiset keksinnön piiriin kuuluvat pesuaineiden muodot sisältävät:

a) Pesuainekoostumuksen, joka on formuloitu pesuainejauheeksi, joka sisältää fosfaattirakenneainetta, anionista pinta-aktiivista ainetta, ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, silikaattia, alkalia halutun pH:n säätämiseksi käyttöön ja neutraalia ei-orgaanista suolaa.

b) Pesuainekoostumuksen, joka on formuloitu pesuainejauheeksi, joka sisältää zeoliittirakenneainetta, anionista pinta-aktiivista ainetta, ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, akryylistä tai ekvivalenttista polymeeriä, silikaattia, alkalia halutun pH:n säätämiseksi käyttöön ja neutraalia ei-orgaanista suolaa.

c) Pesuainekoostumuksen, joka on formuloitu vesipitoiseksi pesuainenesteeksi, joka sisältää anionista pinta-aktiivista ainetta, ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, kostuttavaa ainetta, orgaanista happoa, kaustista alkalia, pH:n ollessa säädetty käytössä arvoon 7-10,5.

d) Pesuainekoostumuksen, joka on formuloitu vedettömäksi pesuainenesteeksi, joka sisältää nestemäistä ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, joka koostuu oleellisesti lineaarisesta alkoksyloidusta primaarisesta alkoholista, fosfaattirakenneaineesta, kaustisesta alkalista, pH:n ollessa säädettynä käytössä arvoon välillä 7-10,5.

e) Pesuainekoostumuksen, joka on formuloitu pesuainejauheeksi, joka on granulaattimuodossa, jonka irtotiheys on vähintään 600

g/l, joka sisältää anionista pinta-aktiivista ainetta ja ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, vähän tai oleellisesti nolla neutraalia ei-orgaanista suolaa, fosfaattirakenneainetta ja natriumsilikaattia.

f) Pesuainekoostumuksen, joka on formuloitu pesuainejauheeksi, joka on granulaattimuodossa, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l, joka sisältää anionista pinta-aktiivista ainetta ja ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, vähän tai oleellisesti nolla neutraalia ei-orgaanista suolaa, zeoliittirakenneainetta ja natriumsilikaattia.

g) Pesuainekoostumuksen, joka on formuloitu pesuainejauheeksi, joka sisältää anionista pinta-aktiivista ainetta, ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, akryylistä polymeeriä, rasvahappo-saippuaa, natriumkarbonaattia, natriumsulfaattia, savipartikkeleita ja natriumsilikaattia.

h) Nestemäisen kompaktin pesuaineen, joka käsittää 5-65 paino-% pinta-aktiivista ainetta, 0-50 paino-% rakenneainetta ja 0-30 paino-% elektrolyyttiä.

Tällä hetkellä on tarkoitettu, että keksinnön mukaisessa pesuainekoostumuksessa [?proteaasi] voidaan lisätä määränä, joka vastaa [?0,001-100] mg entsyymi litraa pesunestettä kohti.

Keksintöä valaistaan täten seuraavissa esimerkeissä, joiden ei ole tarkoitettu rajoittavan millään tavalla keksinnön piiriä.

Esimerkki 1

Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338, viljeltiin 25 °C:ssa kiertoravistuspöydässä (300 rpm) 500 ml:n johtolevy-Erlenmeyer-pulloissa, jotka sisälsivät 100 ml väliainetta, jossa on seuraava koostumus (litraa kohti):

Perunatärkkelys	100 g
Jauhettu ohra	50 g
Soijajauho	20 g
$Na_2HPO_4x12H_2O$	9 g
Pluronic®	0,1 g
natriumkaseinaatti	10 g

Väliaineessa oleva tärkkelys nesteytetään alfa-amylaasilla ja väliaine steriloidaan kuumentamalla 120 °C:ssa 45 minuuttia.

Steriloinnin jälkeen väliaineen pH säädetään 9,0:aan lisäämällä 10 ml natriumkarbonaatin 1 M liuosta.

4 päivän inkuboinnin jälkeen viljelmän proteolyyttinen aktiivisuus määritettiin käyttämällä edellä kuvattua menetelmää.

Viljelyn jälkeen liemen entsyymiaktiivisuus oli 20 CPU/l.

Kiinteän materiaalin erottamisen jälkeen proteaasi puhdistettiin konventionaalisella kromatografisella menetelmällä.

1 l:n viljelmästä peräisin oleva saanto oli 50 ml, jossa 100 CPU/l. Puhtaus oli yli 90 %, pääteltynä SDS-PAGElla.

Tämän esimerkin mukaisesti valmistetun valmisteen piirteet on mainittu aiemmin tässä selityksessä ja niihin viitataan.

Esimerkki 2

Pesuteho

Pesutehotesti suoritettiin ruoholla liatulla puuvillalla 40 °C:ssa isotermisesti 10 minuuttia.

Testit suoritettiin entsyymikonsentraatioissa 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 ja 1,0 mg entsyymiproteiinia litraa kohti.

Käytettiin 5,0 g/l kaupallista eurooppalaista jauhepesuainetta. Pesuaine liuotettiin suunnilleen 9°dH (saksalainen kovuus) veteen ja pH säädettiin 11:een. Tekstiili/pesunestesuhde oli 6 g tekstiiliä litraa pesunestettä kohti.

Pesemisen jälkeen vaatteet huuhdottiin juoksevassa vesijohtovedessä ja ilmakuivattiin. Remissio (%R) 460 nm:ssä määritettiin.

Pesutehon diffrentiaaliremission mittana, delta R, käytettiin ollen yhtäläinen remission kanssa pesun jälkeen entsyymin ol-

lessa lisätty, miinus remissio pesun jälkeen kun mitään entsyymiä ei lisätty.

Näiden testien tulokset on esitetty jäljempänä taulukossa 1 (2 testin keskiarvot).

Taulukko 1

Entsyymikonsentraatio (mg entsyymiproteiinia/litra)	**PD138**	**delta R 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

(- ei tehty)

Differentiaaliremissioarvot osoittavat, että keksinnön mukaisella proteaasilla on erityisiä potentiaaleja pesuaineissa, joissa on suuri ionivahvuus ja korkea pH, jolloin sillä on hyvä pesukyky.

International Application No: PCT/ /

MICROORGANISMS

Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page 1, line 3 of the description [1]

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT [1]

Further deposits are identified on an additional sheet [X] [2]

Name of depositary institution [4]

NATIONAL COLLECTIONS OF INDUSTRIAL & MARINE BACTERIA LTD.

Address of depositary institution (including postal code and country) [5]

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

Date of deposit [6]	Accession Number [7]
3 December 1990	NCIMB 40338

B. ADDITIONAL INDICATIONS [1] (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet [ ]

In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited micro-organism will be made available only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC) until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or is deemed to be withdrawn.

C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE [1] (If the indications are not for all designated States)

D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS [1] (leave blank if not applicable)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later [1] (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")

E. [X] This sheet was received with the international application when filed (to be checked by the receiving Office)

(Authorized Officer)

[ ] The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau [1]

was

(Authorized Officer)

Form PCT/RO/134 (January 1981)

Patenttivaatimukset

1. Proteaasi, **tunnettu** siitä, että sillä on seuraavat ominaisuudet:

a) molekyylipaino 28 kD määritettynä SDS-pagella,
b) pI yli 9,5,
c) pH-optimi yli pH 10 (25 °C:ssa ja kaseiini substraattina),
d) lämpötilaoptimi alueella 45-55 °C (pH:ssa 9,5 ja kaseiini substraattina),
e) immunokemialliset ominaisuudet identtiset kannasta Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338, johdetun proteaasin immunokemiallisten ominaisuuksien kanssa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteaasi, **tunnettu** siitä, että se saadaan kannasta Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338.

3. Bacillus sp. kannan PD138, NCIMB 40338, eristetty biologisesti puhdas viljelmä.

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen proteaasin valmistusmenetelmä, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää patenttivaatimuksen 3 mukaisen proteaasia tuottavan Bacillus sp:n viljelemisen sopivassa ravintoväliaineessa, joka sisältää hiili- ja typpilähteet ja ei-orgaanisia suoloja, mitä seuraa halutun entsyymin talteenotto.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että viljellään Bacillus sp. isäntäorganismia, jossa on geeni, joka koodaa proteaasia, jonka immunokemialliset ominaisuudet ovat identtiset Bacillus sp. PD 138:sta johdetun proteaasin immunokemiallisten ominaisuuksien kanssa.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen proteaasin **käyttö** pesuaineen entsyyminä.

7. Pesuainekoostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaista proteaasia.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen pesuainekoostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää lisäksi yhtä tai useampaa entsyymiä, erityisesti amylaasia, lipaasia, sellulaasia, peroksidaasia ja oksidaasia.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukaista proteaasia käsittävä pesuaineen lisäaine, **tunnettu** siitä, että se on tehty pölyämättömän granulaatin, nesteen, erityisesti stabiloidun nesteen, lietteen tai suojatun entsyymin muotoon.

10. Pesumenetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaisen proteaasin lisäämisen.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen pesumenetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukaisen pesuainekoostumuksen lisäämisen.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen pesumenetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 9 mukaisen pesuaineen lisäaineen lisäämisen.

Patentkrav

1. Proteas, **kännetecknat** av att det har följande egenskaper:

a) molekylvikt på 28 kD, bestämd med SDS-page,
b) pI över 9,5,
c) pH-optimum över pH 10 (vid 25°C och kasein som substrat),
d) temperaturoptimum inom området 45-55°C (vid pH 9,5 och kasein som substrat),
e) immunokemiska egenksaper identiska med immunokemiska egenskaper av proteas som kan härledas från stammen Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338.

2. Proteas enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att det kan erhållas från stammen Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338.

3. Isolerad, biologiskt ren odling av stammen Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338.

4. Förfarande för att framställa ett proteas enligt vilket som helst av patentkraven 1-2, **kännetecknat** av att det innehåller odling av en stam Bacillus sp. enligt patentkravet 3 som producerar proteas i ett lämpligt odlingsmedium, som innehåller kol- eller kvävekällor och oorganiska salter, varefter det önskade enzymet tas tillvara.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, **kännetecknat** av att man odlar Bacillus sp. värdorganism, som har genen som kodar proteas, vars immunokemiska egenskaper är indentiska med immunokemiska egenskaper av proteas som kan härledas från stammen Bacillus sp. PD138.

6. Användning av ett proteas enligt patentkrav 1 som tvättmedelsenzym.

7. Tvättmedelskomposition, **kännetecknad** av att den innefattar ett proteas enligt patentkrav 1.

8. Tvättmedelskomposition enligt patentkrav 7, **kännetecknad** av att den dessutom innefattar en eller flera andra enzymer, särskilt amylaser, lipaser, cellulaser, peroxidaser och oxidaser.

9. Tillsatsmedel för tvättmedel, **kännetecknat** av att det innefattar ett proteas av patentkrav 1, fabricerat i form av icke-dammande granulat, vätska, särskilt stabiliserad vätska, suspension eller skyddat enzym.

10. Tvättförfarande **kännetecknat** av att det innefattar tillsats av ett proteas enligt patentkrav 1.

11. Tvättförfarande enligt patentkrav 10 **kännetecknat** av att det innefattar tillsats av tvättmedelskomposition enligt patentkraven 7 eller 8.

12. Tvättförfarande enligt patentkrav 10 **kännetecknat** av att det innefattar tillsats av tillsatsmedel för tvättmedel enligt patentkrav 9.

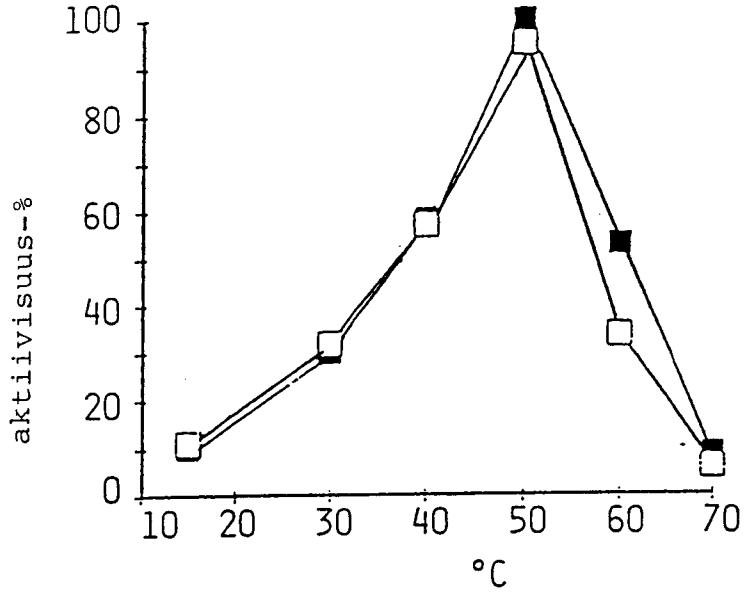
100
80
60
40
20
0
aktiivisuus-%
10
20
30
40
50
60
70
°C

Fig. 1

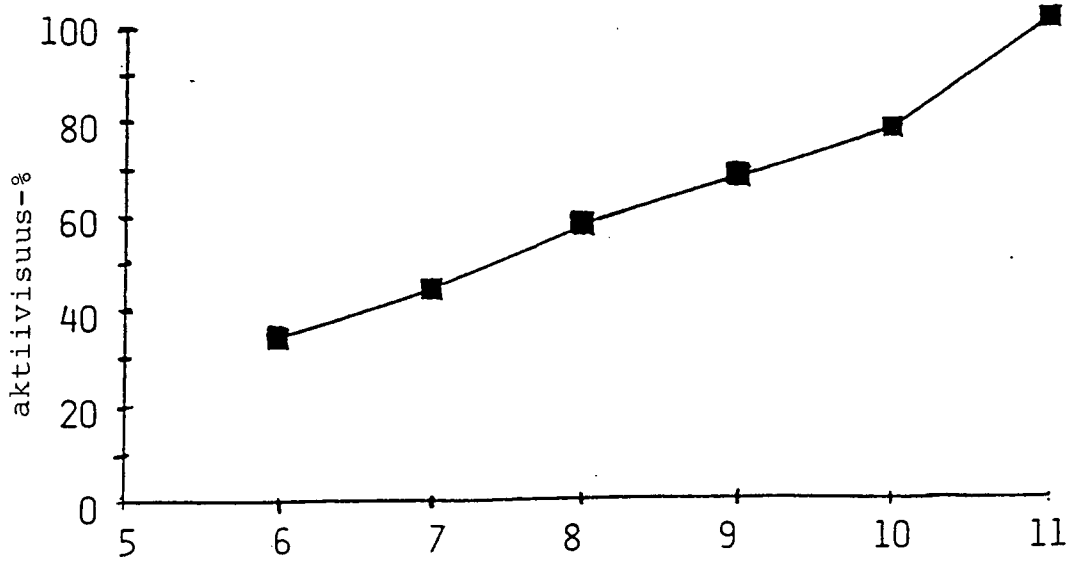
100
80
60
40
20
0
aktiivisuus-%
5
6
7
8
9
10
11

Fig. 2