(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 932538 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 932538

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 9/54
C12N 9/56
C12N 1/21
C12N 15/75
C11D 3/386
C12R 1:07

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **03.06.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **03.06.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **05.12.1993**

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

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

04.06.1992 DE 4218448

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Solvay Enzymes GmbH & Co KG,** Grosse Drakenburger Strasse 93-97, 31564 Nieburg (Weser), SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Vetter, Roman,** Burgdorf, SAKSA, (DE)
2 • **Wilke, Detlef,** Wennigsen, SAKSA, (DE)
3 • **Möller, Bernhard,** BRD, SAKSA, (DE)
4 • **Müller, Martina,** BRD, SAKSA, (DE)
5 • **Mücke, Ingo,** Germany, SAKSA, (DE)
6 • **Takenberg, Meike,** BRD, SAKSA, (DE)
7 • **Konieczny-Janda, Gerhard,** Pattensen, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Bacillus pumilus-kannasta saatavat alkaliset proteaasit
Alkaliska proteaser ur Bacillus pumilus

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

5777 DSM 6879 DSM 6880 DSM

Bacillus pumilus-kannasta saatavat alkaliset proteaasit
Alkaliska proteaser ur Bacillus pumilus

Oheisen keksinnön kohteena ovat Bacillus pumilus-kannasta saatavat alkaliset proteaasit, niiden käyttö sekä menetelmä näiden proteaasien valmistamiseksi.

Alkaliset proteaasit ovat arvokkaita teollisia tuotteita, joilla on edullisia sovellutuksia, erityisesti pesuaineteollisuudessa, koska niiden avulla voidaan poistaa proteiinipitoisia likoja. Jotta nämä proteaasit olisivat vaikutuskykyisiä, niin niillä ei ole ainoastaan oltava proteolyyttistä aktiivisuutta pesuolosuhteissa (pH-arvo, lämpötila), vaan niiden on myös sovittava yhteen pesuaineen muiden komponenttien kanssa, eli niitä on voitava käyttää yhdistelminä muiden entsyymien, tensidien, runkoaineiden (builder), valkaisuaineiden, valkaisuaineaktivaattoreiden sekä muiden lisä- ja apuaineiden kanssa. Näiden proteaasien on erityisesti oltava riittävän stabiileja näiden muiden pesuainekomponenttien vaikutusta vastaan ja niiden pesutehon on oltava riittävä näiden muiden komponenttien läsnäollessa.

Alkalisia proteaaseja on tähän saakka saatu tekniikan nykytason mukaisesti erityisesti viljelemällä Bacillus-lajeja, joista esimerkkeinä voidaan mainita Bacillus alcalophilus, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens ja Bacillus licheniformis, ja jotka tuottavat alkalisia proteaaseja niitä viljelyalustaan erittäen.

Alalla on jo tehty tällaisiin alkalisiin proteaaseihin liittyen lukuisia yrityksiä saada uusia alkalisia proteaaseja, joilla on toivottuja ominaisuuksia. Niinpä alalla tunnetaan jo lukuisia luonnollisia ja keinotekoisesti (geenitekniikan avulla) muunnettuja alkalisia ja erittäin alkalisia proteaaseja. Tästä huolimatta alalla esiintyy tarvetta löytää uusia alkalisia proteaaseja, joilla on erityisesti pesukäyttäytymistä ajatellen edullisia ominaisuuksia.

Näin ollen keksinnön tehtävänä oli valmistaa uusia arvokkaita alkalisia proteaaseja, joilla on edullisia ominaisuuksia.

Keksinnön puitteissa todettiin nyt yllättäen, että alkalisilla Bacillus-proteaaseilla, joita on saatu viljelemällä Bacillus pumilus DSM 5777-kantaa tai jotakin transformoitua, jotakin tällaista proteaasia vastaavan geneettisen informaation sisältävää mikro-organismia, on edullisia ominaisuuksia kuten pH-optimi, joka on noin pH 8,0-11,5 olevalla alkalisella pH-alueella, sekä noin alueella 50-60 °C oleva lämpötilaoptimi sekä erittäin hyvä pesuteho.

Tarkoituksenmukaisesti näillä keksinnön mukaisilla alkalisilla proteaaseilla on aminohapposekvenssi, joka on vähintään 70-prosenttisesti, edullisesti yli 80-prosenttisesti, erityisesti kuitenkin yli 90-prosenttisesti homologinen Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saatujen proteaasien aminohapposekvenssin kanssa. Ohessa homologialla tarkoitetaan huomattavaa samankaltaisuutta kyseisten, keksinnön mukaisten proteaasien aminohapposekvenssien ja Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saatujen proteaasien aminohapposekvenssien välillä. Homologia määritetään siten, että toisiaan vastaavat pätkät Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saatujen protaasien aminohapposekvenssistä ja tähän verrattavasta, muun proteaasin aminohapposekvenssistä asetetaan päällekäin siten, että aminohapposekvenssit saadaan vastaamaan mahdollisimman tarkoin toisiaan, jolloin yksittäisten aminohappojen häviämistä tai lisäyksistä johtuvat erot otetaan huomioon ja kompensoidaan siirtämällä sekvenssipätkiä toistensa suhteen vastaavalla tavalla. Sitten homologisuus saadaan prosentteina määrittämällä näissä sekvensseissä toistensa kanssa samanlaisten aminohappojen ("homologisten asemien") lukumäärä jossakin Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saadussa proteaasissa läsnäolevien aminohappojen kokonaislukumäärän suhteen. Sekvenssien välinen poikkeavuus voi johtua sekä aminohappojen vaihtelusta, lisäyksistä että myöskin häviämistä.

Keksinnön mukaisia proteaaseja saadaan viljelemällä Bacillus pumilus DSM 5777-kantaa tai viljelemällä transformoitua Bacillus-mikro-organismia, joka sisältää jotakin keksinnön mukaista, Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta peräisin olevaa proteaasia vastaavan geneettisen informaation esimerkiksi ilmentämisvektorissa.

Erottamalla Bacillus pumilus DSM 5777-kannan viljelmän supernatantti HPLC-menetelmällä (High Pressure Liquid Chromatography) todetaan, että Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saadaan ainakin kaksi proteaasia, joilla on erilaiset ominaisuudet.

Yksi näistä edullisista keksinnön mukaisista, Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saaduista proteaaseista on alkalinen Bacillus-proteaasi, jolla on seuraavat ominaisuudet:

(1) vaikutus: se pilkkoo proteiineja ja peptidejä;
(2) pH-optimi: noin pH-alueella 10,5-11,0;
(3) pH-stabiilisuus: nämä entsyymit ovat täysin stabiileja pH-alueella 9,7-10,8;
(4) lämpötilaoptimi: noin 60 °C;
(5) lämpötilastabiilisuus: proteaasin inkubointi korkeintaan 45 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan ei heikennä olennaisesti sen aktiivisuutta; sen jälkeen, kun proteaasia on inkuboitu 15 minuutin ajan noin 50 °C:ssa, sen jäännösaktiivisuus on vähintään 90 %.

Toisella edullisella keksinnön mukaisella, Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saadulla proteaasilla on seuraavat ominaisuudet:

(1) vaikutus: se pilkkoo proteiineja ja peptidejä;
(2) pH-optimi: noin pH-alueella 8,5-9;
(3) pH-stabiilisuus: nämä entsyymit ovat täysin stabiileja pH-alueella 5,5-10,5;
(4) lämpötilaoptimi: noin 50 °C;

(5) lämpötilastabiilisuus: proteaasin inkubointi korkeintaan 40 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan ei heikennä olennaisesti sen aktiivisuutta; sen jälkeen, kun proteaasia on inkuboitu 15 minuutin ajan noin 45 °C:ssa, sen jäännösaktiivisuus on vähintään 95 %.

Keksinnön mukaiset Bacillus-proteaasit soveltuvat lisäaineiksi pesu- ja puhdistusainekoostumuksiin ja muihin vastaaviin, joilla on neutraali tai alkalinen pH-arvo, ja joita on tarkoitus käyttää matalissa lämpötiloissa, erityisesti korkeintaan 60 °C olevissa lämpötiloissa. Näin ollen keksinnön kohteena on myös keksinnön mukaisten alkalisten Bacillus-proteaasien käyttö pesuaine-, puhdistusaine- tai astianpesuainekoostumuksissa. Tällöin niitä voidaan myös käyttää edullisesti muiden tavallisten entsyymien, erityisesti myös muiden proteaasien läsnäollessa. Keksinnön mukaisten alkalisten proteaasien eräänä erityisen edullisena käyttösovellutuksena on niiden käyttö pesuaine-, puhdistusaine- tai astianpesuainekoostumuksissa, joita on tarkoitus käyttää matalissa lämpötiloissa, erityisesti korkeintaan 60 °C:n lämpötilassa, edullisesti noin alueella 30-60 °C olevassa lämpötilassa.

Keksinnön kohteena ovat edelleen sellaiset pesuaine-, puhdistusaine- ja astianpesuainekoostumukset, jotka sisältävät vähintään yhtä keksinnön mukaista alkalista proteaasia. Tätä käyttösovellutusta varten keksinnössä saadaan aikaan joukko uusia alkalisia proteaaseja, joilla on edullisia ominaisuuksia, ja joiden avulla voidaan poistaa edullisella tavalla proteiinipitoisia likoja. Sekä munankeltuaista että verta ja maitoa sisältävät liat saadaan häviämään yhtä hyvin. Näiden pesuainekoostumusten sisältämien muiden komponenttien ei olla todettu häiritsevän käytännöllisesti katsoen lainkaan keksinnön mukaisten proteaasien pesutehoa.

Keksinnön mukaisia proteaaseja voidaan käyttää pesu- ja puhdistusainekoostumuksissa, esimerkiksi jauhemaisissa pesuainekoostumuksissa joko yksinään tai toivottaessa myös yhdessä toistensa kanssa, mahdollisesti myös yhdessä tekniikan nykytason

mukaisten pesu- ja puhdistusaineproteaasien tai muiden, tällaisissa koostumuksissa tavallisten entsyymien kuten esimerkiksi proteaasien, amylaasien, lipaasien, pektinaasien, nukleaasien, oksidoreduktaasien, sellulaasien ja muiden vastaavien kanssa. Keksinnön mukaisia proteaaseja käytetään tällaisissa pesu- ja puhdistusainekoostumuksissa pesuaine-entsyymeille sinänsä tavanomaisina määrinä, edullisesti korkeintaan 3 paino-% olevana määränä (kokonaiskoostumuksen kuiva-aineesta laskien), edullisesti alueella 0,2-1,5 paino-% olevana määränä.

Keksinnön mukaiset pesu- ja puhdistusaineet voivat sisältää näiden mainittujen pesuaine-entsyymien lisäksi myös kaikkia muita tekniikan nykytason mukaisia, sinänsä tavallisia pesuainekomponentteja kuten tensidejä, valkaisuaineita tai runkoaineita (builder), sekä muita tavallisia, pesuaineiden muodostamiseksi käytettyjä apuaineita sinänsä tavallisina määrinä. Tällaisia apuaineita ovat esimerkiksi tehosteet, entsyymistabilisaattorit, liankantajat ja/tai yhteensopivuutta parantavat aineet, kompleksien ja kelaattien muodostajat, saippuavaahtoa säätelevät aineet sekä sellaiset lisäaineet kuten optiset kirkasteet, sameutta lisäävät aineet, korroosionestoaineet, staattista sähköisyyttä vähentävät aineet, väriaineet, bakterisidit, valkaisuaineaktivaattorit, perhappovalkaisuaineiden esiasteet.

Niinpä keksinnön mukaiset pesuainekoostumukset sisältävät tyypillisen, esimerkkinä esitetyn suoritusmuodon mukaisesti, kuiva-aineesta laskien:

a) vähintään 5 paino-%, esim. 10-50 paino-% jotakin tensidiä tai tensidiseosta;
b) korkeintaan 40 paino-% runkoainetta tai runkoaineseosta;
c) korkeintaan 40 paino-% valkaisuainetta tai valkaisuaineseosta, edullisesti perboraattia kuten natriumperboraatti-tetrahydraattia tai natriumperboraatti-monohydraattia,
d) korkeintaan 3 paino-% vähintään yhtä keksinnön mukaista proteaasia;

e) muita aineosia kuten apuaineita niin paljon, että saadaan 100 %.

Tällaiset pesuainekoostumukset voidaan valmistaa sinänsä tavallisella tavalla. Tällöin keksinnön mukaiset proteaasit voidaan sekoittaa sinänsä tunnetulla tavalla esimerkiksi rakeina, kokkareina tai pelletteinä, jotka on mahdollisesti varustettu pinnoitteella, pesuainekoostumuksen muihin komponentteihin.

Keksinnön mukaiset proteaasit soveltuvat tämän lisäksi hyvin sinänsä tavallisiin nestemäisiin pesuainevalmisteisiin.

Keksinnön mukaisia alkalisia proteaaseja voidaan saada siten, että Bacillus pumilus DSM 5777-kantaa tai jotakin muuta, keksinnön mukaisia proteaaseja vastaavan geneettisen informaation sisältävää mikro-organismia viljellään, minkä jälkeen muodostunut alkalinen proteaasi eristetään viljelmän supernatantista. Tällöin alkaliset proteaasit eristetään viljelmän supernatantista sinänsä tunnetulla tavalla siten, että solut erotetaan suodattamalla tai sentrifugoimalla, proteaasi väkevöidään kalvosuodatuksella tai saostamalla, se puhdistetaan ja mahdollisesti myös eristetään ja sitä käytetään toivotussa sovellutuksessa.

Keksinnön mukaisten proteaasien valmistukseen voidaan käyttää itse Bacillus pumilus DSM 5777-kantaa tai jotakin transformoitua Bacillus pumilus-kantaa, joka sisältää geneettisen informaation jotakin keksinnön mukaista proteaasia varten esim. ilmentämisvektorissa.

Myös muita mikro-organismeja, erityisesti Bacillus-kantoja, joihin on tätä ennen istutettu transformoimalla välttämätön geneettinen informaatio keksinnön mukaisia proteaaseja ja niiden ilmentämistä varten, voidaan käyttää keksinnön mukaisten proteaasien valmistamiseksi ja talteenottamiseksi suuressamittakaavassa, erityisesti tuotannon yksinkertaistamiseksi ja optimoimiseksi sekä saannon parantamiseksi.

Näin ollen keksinnön kohteena on myös menetelmä keksinnön mukaisten alkalisten proteaasien valmistamiseksi transformoitujen mikro-organismien avulla, joiden mikro-organismien käsittämä ilmentämisvektori sisältää proteaasien ilmentämiseen tarvittavat DNA-sekvenssit sekä yhden sellaisen DNA-sekvenssin, joka koodaa jonkin edellä kuvatun, keksinnön mukaisen alkalisen proteaasin aminohapposekvenssiä. Tätä keksinnön mukaisesti transformoitua mikro-organismia viljellään edellä kuvatulla tavalla ja alkalinen proteaasi eristetään viljelyalustasta. Keksinnön mukaisen proteaasin valmistuksen ja talteenoton kannalta edullisia transformoituja mikro-organismeja ovat Bacillus-lajit kuten Bacillus subtilis, Bacillus alcalophilus, Bacillus licheniformis tai Bacillus amyloliquefaciens. Keksinnön mukaisesti transformoitujen mikro-organismien tunnusomaisena piirteenä on erityisesti se, että ne on transformoitu ilmentämisvektorilla, joka sisältää geneettisen informaation Bacillus pumilus-bakteerista peräisin olevaa alkalista proteaasia varten, joka bakteeri on talletettu 09.02.1990 talletusnumerolla DSM 5777 kantakokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Saksan liittotasavalta. Keksinnön piiriin kuuluvat samoin myös 23.02.1992 talletusnumeroilla DSM 6879 ja DSM 6880 talletetut mikro-organismit sekä näistä mikro-organismeista eristettävät plasmidit, jotka sisältävät geneettisen informaation edellä kuvattuja, keksinnön mukaisia proteaaseja varten.

Edellä kuvatussa menetelmässä käytetyt transformoidut mikro-organismit, jotka kuuluvat keksinnön piiriin, voidaan tuottaa siten, että

a) sopivasta bakteerikannasta, joka tuottaa sellaista alkalista proteaasia, jonka aminohapposekvenssi on vähintään 70-prosenttisesti, edullisesti yli 80-prosenttisesti, erityisesti kuitenkin yli 90-prosenttisesti homologinen Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saadun proteaasin aminohapposekvenssin kanssa, eristetään ensin tätä proteaasia koodaava DNA-sekvenssi (eli proteaasin rakennegeeni),
b) tämän DNA-sekvenssin nukleotidijärjestys määritetään mahdollisesti proteaasin lisätunnistamista varten,

c) sitten tämän eristetyn DNA-sekvenssin avulla valmistetaan ilmentämisvektori ja
d) saatu ilmentämisvektori transformoidaan sopivaan mikro-organismiin, jota voidaan lopulta käyttää alkalisen proteaasin tuottamiseksi.

Seuraavassa kuvataan tarkemmin jokainen menetelmävaihe keksinnön mukaisten alkalisten proteaasien eristämiseksi ja talteenottamiseksi edellä kuvatun menetelmän mukaisesti, sekä tällä tavalla saadut, osittain myöskin keksinnön kohteena olevat välituotteet, jotka ovat proteaasigeenin sisältäviä DNA-sekvenssejä tai DNA-istutteita, vektoreita, erityisesti ilmentämisvektoreita ja transformoituja mikro-organismeja.

Keksinnön mukaisten alkalisten proteaasien aminohapposekvenssejä koodaavia rakennegeenejä voidaan saada sinänsä tunnetuilla yleisillä menetelmillä. Tätä tarkoitusta varten esim. Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta ("luovuttajabasilli") eristetään kromosomaalinen DNA sinänsä tunnetuilla menetelmillä ja se hydrolysoidaan osittain sopivilla restriktioendonukleaaseilla.

Nämä luovuttaja-DNA:sta saadut restriktiokappaleet voidaan tämän jälkeen erottaa koon perusteella geelielektroforeesilla tai sentrifugoimalla sakkaroosin tiheysgradientin avulla, minkä jälkeen toivotun kokoiset kappaleet yhdistetään uudelleen sopivan vektori-DNA:n kanssa. Vektorina käytetään tarkoituksenmukaisesti plasmidia, joka sallii käytettyyn isäntäorganismiin istutetun vieraan DNA:n ilmentymisen. Kuten esimerkeissä on kuvattu, tässä yhteydessä voidaan käyttää esimerkiksi plasmidia, josta käytetään merkintää pUB131, ja joka on saatu plasmidista pUB110 liittämällä siihen polykytkijäkohta.

Edellä in vitro-uudelleenyhdistämällä saatu DNA voidaan nyt istuttaa esimerkiksi ohessa käytettyyn Bacillus subtilis PSL 1-kantaan. Transformantit, eli isäntäsolut, jotka ovat ottaneet vastaan tämän yhdistämällä saadun DNA:n, voidaan valikoida tunnettujen, vektori-DNA:ssa läsnäolevien merkitsimien

(esim. neomysiinin vastususkyvyn) avulla. Näiden antibiootille vastustuskykyisten transformanttien joukosta voidaan etsiä sellaisia klooneja, jotka erittävät enemmän proteaasia. Näistä transformanteista voidaan eristää ne, jotka kykenevät erittämään keksinnön mukaista proteaasia. Lopulta positiivisesta kloonista eristetään näihin transformantteihin istutettu plasmidi-DNA.

Tämä plasmidi sisältää vektori-DNA:n, jonka restriktiokohdat tunnetaan, ohella toivotun, keksinnön mukaisen, Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saadun alkalisen proteaasin rakennegeenin sekä mahdollisesti muita, ohessa kuitenkin tarpeettomia, luovuttajakannasta peräisin olevia DNA-sekvenssejä. Esimerkkeinä tällaisista proteaasipitoisista plasmideista ovat ne plasmidit, joista käytetään merkintää pPP46 ja pPP415. Plasmidin pPP46 on 7,6 kb:n kokoinen ja se koodaa keksinnön mukaista, Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta peräisin olevaa proteaasia P46. Plasmidin pPP415 on 6,2 kb:n kokoinen ja se koodaa keksinnön mukaista, Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta peräisin olevaa proteaasia P415.

Näiden plasmidien kyky ilmentää vastaavaa alkalista proteaasia voidaan selvittää siten, että bakteeri, erityisesti edellä kuvatun tyyppinen Bacillus-laji transformoidaan jollakin tällaisella plasmidilla ja täten saatuja transformantteja viljellään ja syntynyt proteaasiaktiivisuus määritetään. Tämän lisäksi saatuja transformantteja voidaan myös viljellä keksinnön mukaisten alkalisten proteaasien valmistamiseksi ja talteenottamiseksi, jolloin saadaan aikaisemmin edellä kuvattuja, keksinnön mukaisia alkalisia proteaaseja.

Näiden keksinnön mukaisten, Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saatujen proteaasien tunnusomaisena piirteenä ovat niiden edulliset ominaisuudet. Niiden stabiilisuus on hyvä alkalisissa pH-arvoissa. Keksinnön mukaisten proteaasien pH-optimi on pesu- ja puhdistusainekoostumuksien käytön kannalta edullisella, noin 8,0-11,5 olevalla pH-alueella. Edelleen keksinnön mukaisten proteaasien lämpötilaoptimi on noin alueella

50-60 °C. Lisäksi niiden stabiilisuus on myös hyvä pesuliuoksessa. Sen ansiosta, että keksinnön mukaisten Bacillus-proteaasien aktiivisuus on edullinen korkeintaan 60 °C olevassa lämpötilassa, niitä voidaan käyttää erityisesti sellaisissa puhdistus- ja pesuainekoostumuksissa, joita on tarkoitus käyttää matalissa lämpötiloissa, erityisesti korkeintaan 60 °C:ssa, edullisesti alueella 30-60 °C olevassa lämpötilassa. Keksinnön mukaista proteaasia sisältävien pesu- ja puhdistusainekoostumusten pesuteho on edullinen proteiinipitoisten likojen poistamista ajatellen.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat keksinnön tyypillisiä esimerkinomaisia suoritusmuotoja keksintöä kuitenkaan millään tavalla rajoittamatta.

Mikäli toisin ei olla mainittu, ohessa meneteltiin yleisesti noudattaen menetelmiä, jotka on kuvattu teoksessa T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

Mitä erilaisimmat ohessa käytetyt restriktioendonukleaasit ovat tekniikan nykytason mukaisia ja niitä on saatavana kaupallisesti. Näiden tunnettujen restriktioendonukleaasien käytön kannalta kulloinkin välttämättömät reaktio-, kofaktori- ja muut olosuhteet ovat samoin tunnettuja. Esimerkiksi noin 1 µg:n suuruista DNA-määrää kohden voidaan käyttää yhtä yksikköä (1 U = 1 Unit) restriktioendonukleaasia noin 20 µl:ssa puskuriliuosta. Tavallisesti käytettiin, 37 °C:n lämpötilassa toimittaessa, noin yhden tunnin pituista riittävää inkubointiaikaa, mutta inkubointiolosuhteet voidaan kuitenkin sovittaa vastaamaan kulloinkin esiintyviä vaatimuksia. Restriktioendonukleaasin kanssa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen proteiini poistettiin uuttamalla (esim. fenolilla ja kloroformilla) ja pilkkoutunut DNA eristettiin (esim. etanolisaostuksella vesipitoisesta fraktiosta) ja sitä käytettiin muissa toimenpiteissä.

Sen jälkeen, kun DNA tai vektorit on pilkottu restriktioendonukleaaseilla, päättävä 5′-fosfaattijäännös voidaan mahdollisesti hydrolysoida alkalisella fosfataasilla (defosforylaatio). Mikäli esimerkeissä on toteutettu 5′-pään defosforylaatio, niin se on toteutettu sinänsä tunnetulla tavalla. Defosforylaation toteuttamista ja siinä tarvittavia reagensseja on kuvattu lähemmin Maniatis:in et al. teoksessa (s. 133-134).

Osittainen hydrolyysi tarkoittaa DNA:n epätäydellistä pilkkomista restriktioendonukleaasilla. Reaktio-olosuhteet valitaan tällöin siten, että DNA-substraatti pilkkoutuu käytetyn restriktioendonukleaasin eräiden, ei kuitenkaan kaikkien tunnistamiskohtien kohdalta.

Tiettyjen DNA-kappaleiden talteenottamiseksi ja eristämiseksi, esimerkiksi sen jälkeen, kun DNA:ta on käsitelty restriktioendonukleaaseilla, saadut DNA-kappaleet erotetaan toisistaan geelielektroforeettisesti (esim. agaroosigeeliä käyttäen), minkä jälkeen ne tunnistetaan molekyylipainon avulla (vertaamalla niitä viite-DNA-kappaleisiin, joiden molekyylipaino tunnetaan) ja toivottu DNA-kappale erotetaan vastaavasta geelivyöhykkeestä.

Ligaatiot voidaan toteuttaa sinänsä tunnetuissa olosuhteissa, esimerkiksi puskurissa käyttämällä noin 10 yksikköä T4 DNA-ligaasia ligatoitavien DNA-kappaleiden jokaista 0,5 µg:aa kohden (katso Maniatis et al., s. 146).

Transformoinnilla ymmärretään DNA:n istuttamista mikro-organismiin siten, että DNA kykenee replikoitumaan tai ilmentymään siinä. Bacillus-lajien tapauksessa voidaan käyttää esimerkiksi menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa Anagnostopolous et al., 1961, J. Bacteriol., 81: 746-791.

Seuraavissa esimerkeissä entsyymistabiilisuus on ilmoitettu siten, että "täysin stabiili" tarkoittaa sitä, että jäännösaktiivisuus on vähintään 90 %; ja "stabiili" tarkoittaa sitä, että jäännösaktiivisuus on vähintään 80 %.

Ohessa käytetty, esimerkissä 1 ja keksinnön selityksessä kuvattu Bacillus pumilus-kanta on eristetty luonnosta ja se on talletettu 07.02.1990 kantakokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM) talletusnumerolla DSM 5777. Esimerkissä 3 kuvattu, plasmidilla pPP46 transformoitu B. subtilis PSL1-kanta on talletettu talletusnumerolla DSM 6879 ja esimerkissä 3 kuvattu, plasmidilla pPP415 transformoitu B. subtilis PSL1-kanta on talletettu talletusnumerolla DSM 6880 kantakokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen 22.01.1992. Muita käytettyjä mikro-organismeja, esim. Bacillus subtilis PSL1 (Bacillus Genetic Stock Center 1 A 510) tai Bacillus BD366 (Bacillus Genetic Stock Center 1 E 6) on saatavana kaupallisesti.

Kuviot 1 ja 2 esittävät Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saatujen proteaasien P46 (kuvio 1) ja P415 (kuvio 2) lämpötilaoptimia.

Kuviot 3 ja 4 esittävät Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saatujen proteaasien P46 (kuvio 3) ja P415 (kuvio 4) lämpötilastabiilisuutta.

Kuviot 5 ja 6 esittävät Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saatujen proteaasien P46 (kuvio 5) ja P415 (kuvio 6) pH-optimia.

Kuviot 7 ja 8 esittävät Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta saatujen proteaasien P46 (kuvio 7) ja P415 (kuvio 8) pH-stabiilisuutta. pH-arvon säätämiseen käytettiin pH-alueella 5-7 0,1 M fosfaattipuskuria, pH-alueella 7-9 0,1 M Tris-HCl-puskuria ja pH-alueella 9-12,1 0,2 M glysiini-NaOH-puskuria.

Kuvio 9 esittää proteaasin P415 pesutehoa koekudokseen M-PC entsyymiannostuksen funktiona (delta R = heijastusero).

Kuvio 10 esittää proteaasin P415 pesutehoa koekudokseen Y-MC entsyymiannostuksen funktiona (delta R = heijastusero).

Kuvio 11 esittää proteaasin P415 pesutehoa koekudoksiin entsyymiannostuksen funktiona (delta R = heijastusero).

Esimerkki 1

Bacillus pumilus-organismin eristäminen luonnosta ja sen tunnistaminen

Bacillus pumilus-kanta eristettiin luonnosta ja se talletettiin kantakokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen talletusnumerolla DSM 5777.

Kysymyksessä on Bacillus-sukuun kuuluva gram-positiivinen, itiöitä muodostava, aerobi mikro-organismi. Seuraavassa kuvataan solu- ja pesäkemorfologiset ominaisuudet, biokemialliset reaktiot ja reaktiot tiettyihin kasvuolosuhteisiin on esitetty taulukossa 1.

Bacillus pumilus DSM 5777:

Kulmistaan pyöristetyn sauvan muotoinen bakteeri. Gram-reaktio (gram-värjäys, KOH-koe) on positiivinen. TY-agarilla (katso alla) 37 °C:ssa kasvatettaessa pesäkkeiden läpimitta on 3,2-4,2 mm 2 vuorokauden kuluttua, ne ovat vaaleanruskeita ja niiden reuna on tasainen tai aaltomainen. Joskus pesäkkeiden päällä esiintyy pienten pisaroiden muodostusta; pesäkkeet voivat olla kiiltäviä tai kuivuneita ja ryppyisiä. Tällä TY-agarilla solujen koko on 0,8-0,9 µm * 1,2-2,8 µm, ja ne esiintyvät tavallisesti yksittäisinä soluina tai kahden tai kolmen solun ketjuna. Itiöt ovat soikeita ja ne sijaitsevat keskellä tai lähes solun päässä. Tämä kanta muodostaa soluja hyvin halukkaasti.

TY-agar:

Hiivauute	5 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	8,75 g
$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	0,016 g
Agar	16 g
Kahteen kertaan tislattu vesi, siten, että tilavuudeksi saadaan	1000 ml
pH	7,0 ± 0,3.

Niiden tulosten, jotka saatiin toteuttamalla taulukossa 1 mainitut kokeet [jotka on kuvattu teoksessa Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, 1121-1125, P.H.A. Sneath (toim.), Williams ja Wilkins, Baltimore-Lontoo-Los Angeles-Sydney, 1986], perusteella voidaan toteuttaa luokitus Bacillus pumilus-lajiksi. Eristetty kanta DSM 5777 poikkeaa vain eräiden ominaisuuksiensa suhteen (Voges-Proskauer Test, V-P-ravintoliuoksen pH sekä munanvalkuais-lesitinaasin muodostus sekä kasvu 7 % NaCl-liuoksessa) tässä teoksessa Bacillus pumilus-organismille kuvatuista tunnusomaisista piirteistä.

Bacillus pumilus on kaikkialla esiintyvä mikro-organismi, joka muodostaa elatusalustalla ulkonäöltään vaihtelevia pesäkkeitä.

Taulukko 1*

Ominaisuus	Bacillus DSM 5777	Bacillus pumilus
Solun halkaisija > 1 µm	-	-
Pyöreä itiömuoto	-	-
Turvonnut sporangium	-	-
Parasporaaliset kiteet	-	-
Katalaasi	+	+
Anaerobinen kasvu	-	-
Voges-Proskauer-koe	-	+
pH V-P-ravintoliuoksessa		
<6		+
>7	+	

Hapon muodostuminen johtuen		
glukoosista	+	+
L-arabinoosista	+	+
D-ksyloosista	+	+
D-mannitolista	+	+
Kaasun muodostuminen glukoosin läsnäollessa	-	-
Kaseiinin hydrolyysi	+	+
Gelatiinin hydrolyysi	+	+
Tärkkelyksen hydrolyysi	-	-
Sitraatin metaboloituminen	+	+
Propionaatin metaboloituminen	-	-
Tyrosiinin hajoaminen	-	-
Amiinin poisto fenyyli-alaniinista	-	-
Munankeltuainen-lesitinaasi	+	-
Nitraatin pelkistyminen nitriitiksi	-	-
Indolin muodostuminen	-	-
Dihydroksiasetonin muodostuminen	-	e. m.
NaCl- ja KCl-tarve	e. m.	-
Allantoiini- tai ureaattitarve	e. m.	-
Kasvu, kun RL:n pH on		
6,8	+	+
5,7	+	+
Kasvu NaCl-liuoksessa		
2 %	e. m.	+
5 %	+	+
7 %	-	+
10 %	-	e. m.
Kasvu		
5 °C:ssa	e. m.	-
10 °C	e. m.	+
30 °C	+	+
40 °C	e. m.	+
50 °C	e. m.	d
55 °C	e. m.	-
65 °C	e. m.	-

Kasvu lysotsyymin läsnäollessa	+	d
Autotrofi seoksen H_2 + CO_2 tai CO:n läsnäollessa	e.m.	-

* Tiedot saatu teoksesta Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, s. 1123, P.H.A. Sneath (toim.), Williams ja Wilkins, Baltimore-Lontoo-Los Angeles-Sydney, 1986.
\+ Positiivisia oli 90 % tai enemmän.
\- Negatiivisia oli 90 % tai enemmän.
d Positiivisia oli 11-89 %.
e.m. ei määritetty.
RL ravintoliuos.

Esimerkki 2

Plasmidin pUB131 valmistus

Bacillus subtilis BD366 (pUB110)-kannasta (Bacillus Genetic Stock Center 1 E 6) eristettiin plasmidi pUB110 menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa T.J. Gryczan et al., 1978, J. Bacteriol., 34: 318-329, ja sitten se puhdistettiin Maniatis:in et al. mukaisesti (s. 93) cesiumkloridin tiheysgradienttia hyväksikäyttävällä sentrifugoinnilla. Vektori pUB110 sisältää restriktioendonukleaasien BamHI ja EcoRI restriktiokohdat vain yhteen kertaan ja merkitsimenä sellaisen DNA-sekvenssin, joka saa aikaan neomysiiniantibiootin vastustuskyvyn, sekä DNA-sekvenssit, joita tarvitaan Bacillus-lajissa tapahtuvaa replikaatiota varten ("replikaation alkamiskohta").

Edellä saatu plasmidi pUB110 rajoitettiin endonukleaaseilla EcoRI ja BamHI, jolloin saatiin suurempi ja pienempi kappale. Pienempi 790 bp:n (bp = emäsparia) kappale korvattiin 67 bp:n suuruisella polykytkijällä, joka oli tätä ennen eristetty EcoRI/BglII-kappaleena vektorista M13tg131. Täten saatu vektori, josta käytetään merkintää pUB131, on näin ollen plasmidin pUB110 johdannainen, josta pUB110:sta on hävitetty noin 0,8 kb:n suuruinen EcoRI/BamHI-kappale, joka on korvattu polykloonauskohdalla.

Esimerkki 3

Bacillus pumilus DSM 5777-bakteerista peräisin olevien alkalisten proteaasien P46 ja P415 kloonaaminen

Esimerkissä 1 kuvatusta, luonnosta eristetystä Bacillus pumilus DSM 5777-kannasta erotettiin kromosomaalinen DNA menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa Saito et al., 1963, Biochim. Biophys. Acta., 72, sivut 619-629, ja se hydrolysoitiin osittain restriktioendonukleaasilla Sau3A. Restriktiokappaleet erotettiin elektroforeettisesti agaroosigeelillä ja 3-8 kb:n (kb = kiloemästä) suuruiset kappaleet eristettiin.

Bacillus DSM 5777-kannasta eristetyt DNA-kappaleet yhdistettiin uudelleen in vitro plasmidin pUB131 vektori-DNA:han (valmistettu esimerkin 3 mukaisesti).

Tätä tarkoitusta varten plasmidi pUB131 rajoitettiin ensin restriktioendonukleaasilla BamHI, minkä jälkeen se defosforyloitiin vasikan suolistosta saadulla alkalisella fosfataasilla. Sitten 4 µg rajoitettua ja defosforyloitua vektori-DNA:ta ja 20 µg Bacillus DSM 5777-kannasta saatua DNA-kappaletta inkuboitiin 200 µl:n kokonaistilavuudessa yhdessä T4 DNA-ligaasin kanssa 24 tunnin ajan 16 °C:n lämpötilassa.

Tällä in vitro uudelleen yhdistämällä saadulla DNA:lla transformoitiin Bacillus subtilis PSL1-kannan (Bacillus Genetic Stock Center 1 A 510) protoplasteja menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa S. Chang ja N. Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet., 168, sivut 111-115. Transformantit valikoitiin neomysiiniä sisältävillä levyillä, minkä jälkeen ne siirrettiin rasvattomaan maitoon perustuville agarmaljoille. Noin 100 000 saadun neo^{r}-transformantin joukosta löydettiin muutama klooni, joiden voitiin todeta erittävän voimakkaammin proteaasia vastaavan pesäkkeen ympärillä olevan kirkkaan alueen perusteella.

Näitä klooneja viljeltiin 24 tunnin ajan TY-alustassa, joka sisälsi 10 µg/ml neomysiiniä (10 g tryptonia, 5 g hiivauutetta, 4,1 mg $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ ja 16 mg $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ sekä kahdesti tis-

lattua vettä siten, että kokonaistilavuudeksi saatiin 1000 ml). Viljelmän supernatantissa läsnäolevat proteaasit erotettiin HPLC-kolonnilla (Ultropak TSK CM-2SW, 250 x 4,6 mm; yhtiöstä LKB) ja ne ilmaistiin UV-valolla (280 nm). Piikit, joissa esiintyi proteolyyttistä aktiivisuutta, voitiin erottaa muista proteiinipiikeistä tämän jälkeen seuraavan virtausinjektioanalyysin avulla (substraatti: asetyylikaseiini; ilmaiseva reagenssi: trinitrobentseenisulfonihappo; ilmaisu aallonpituudella 420 nm). Isännän omia proteaaseja voimakkaammin erittävien kloonien ohella löydettiin myös sellaisia, jotka erittivät isännän omien proteaasien ohella kulloinkin myös yhtä, isännälle vierasta proteaasia. Eluoitumisaikojen perusteella voitiin tunnistaa kaksi erilaista, isännälle vierasta proteaasia, joista alettiin käyttää merkintää P46 ja P415. Näistä klooneista, jotka erittivät Bacillus pumilus DSM 5777-viljelmän supernatanteissa läsnäolevia proteaaseja, ja jotka siis sisälsivät näitä proteaaseja vastaavan geneettisen informaation, peräisin olevista plasmideista alettiin käyttää merkintää pPP46 ja pPP415. Plasmidi pPP46 on kooltaan 7,6 kb ja plasmidi pPP415 on kooltaan 6,2 kb. Plasmidilla pPP46 transformoitu B. subtilis PSL1-kanta on talletettu 23.01.1992 kantakokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen talletusnumerolla DSM 6879. Plasmidilla pPP415 transformoitu B. subtilis PSL1-kanta on talletettu 23.01.1992 kantakokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen talletusnumerolla DSM 6880.

Esimerkki 4

B. pumilus DSM 5777-kannasta peräisin olevien alkalisten proteaasien P46 ja P415 valmistus

Plasmidit pPP46 ja pPP415 eristettiin esimerkin 3 mukaisista klooneista B. subtilis PSL1 (pPP46) sekä B. subtilis PSL1 (pPP415) ja ne istutettiin luovuttajakantaan B. pumilus DSM 5777. Transformointi tapahtui protoplastien transformointina noudattaen menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa Chang ja Cohen (katso esimerkki 2). Sitten 40 ml:aan esiviljelyalustaa (10 g tryptonia, 5 g hiivauutetta, 5 g NaCl, 10 mg neomysiiniä ja kahdesti tislattua vettä siten, että kokonaistilavuudeksi

saatiin 1000 ml), joka oli 500 ml:n ravistelupulloissa, siirrostettiin B. pumilus DSM 5777 (pPP46)-kannan tai B. pumilus DSM 5777 (pPP415)-kannan yksittäinen pesäke agarmaljalta. Viljelmää inkuboitiin 16 tunnin ajan 37 °C:n lämpötilassa, nopeudella 250 kierr./min. ravistellen. Tästä viljelmästä otettiin 1 ml, joka siirrostettiin 40 ml:aan varsinaista viljelyalustaa (40 g soijajauhoa, 90 g perunatärkkelystä, 1,5 g Na_2SO_4, 3,5 mg $MnCl_2$, 10 mg neomysiiniä ja kahdesti tislattua vettä siten, että kokonaistilavuudeksi saatiin 1000 ml), joka oli 500 ml:n ravistelupullossa. Tätä varsinaista viljelmää inkuboitiin 30 tunnin ajan nopeudella 320 kierr./min. ravistellen muuten samoissa olosuhteissa kuin esiviljelmääkin, ja se sentrifugoitiin 30 tunnin kuluttua.

Supernatantista voitiin puhdistaa alkaliset proteaasit FPLC-menetelmällä [CM Sepharose FF (Pharmacia), eluointipuskuri 0,05 M Na-asetaatti, pH 6, ja 0,8 M Na-asetaatti, pH 6], tai viljelmän supernatanttia käytettiin suoraan muissa kokeissa.

Esimerkki 5

Bacillus pumilus-proteaasien entsymaattisten ominaisuuksien määrittäminen

Proteaasien aktiivisuus määritettiin Delft Units-yksikköinä (DU). 1000 DU on se proteolyyttinen aktiivisuus, joka tuottaa 1 ml:n tilavuudessa 2 %:sta (paino/paino) entsyymiliuosta kaseiinin hajoamisen jälkeen ekstinktioeroksi 0,4000 (1 cm:n pituinen valoreitti; 275 nm; määritetty sokeakoetta vastaan).

Entsymaattisten ominaisuuksien kuten lämpötilaoptimin, lämpötilastabiilisuuden, pH-optimin ja pH-stabiilisuuden määrittämiseen käytettiin esimerkissä 4 kantoja Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP46) ja DSM 5777 (pPP415) viljelemällä saatujen viljelmien supernatantteja.

Näissä viljelmän supernatanteissa läsnäolevien proteaasien lämpötilaoptimi määritettiin alueella 40-73 °C. Tulokset on esitetty taulukossa 2 sekä kuvioissa 1 ja 2.

Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP46)-kannasta saadun proteaasin P46 lämpötilaoptimi on 60 °C (kuvio 1).

Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP415)-kannasta saadun proteaasin P46 lämpötilaoptimi on 50 °C (kuvio 2).

Taulukko 2
Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP46)- ja DSM 5777 (pPP415)-kannasta saatujen alkalisten proteaasien lämpötilaoptimi

Alkalinen proteaasi	Aktiivisuuden (%) riippuvuus lämpötilasta (°C) 40°C	50°C	60°C	65°C	73°C
P46	34 %	59 %	100 %	50 %	16 %
P415	56 %	100 %	45 %	32 %	10 %

Lämpötilastabiilisuuden määrittämiseksi proteaasipitoisia supernatantteja inkuboitiin 15 minuutin ajan eri lämpötiloissa ja tämän jälkeen määritettiin jäännösaktiivisuus. Tulokset on esitetty taulukossa 3 sekä kuvioissa 3 ja 4.

Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP46)-kannasta saatu proteaasi P46 on stabiilia 50 °C:n lämpötilaan saakka (jäännösaktiivisuus >90 %) ja sen jäännösaktiivisuudeksi saatiin vielä 57,3 % (kuvio 3) sen jälkeen, kun sitä oli inkuboitu 15 minuutin ajan 55 °C:n lämpötilassa.

Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP415)-kannasta saatu proteaasi P415 on stabiilia 45 °C:n lämpötilaan saakka (jäännösaktiivisuus >90 %) ja sen jäännösaktiivisuudeksi saatiin vielä 76,4 % (kuvio 4) sen jälkeen, kun sitä oli inkuboitu 15 minuutin ajan 50 °C:n lämpötilassa.

Taulukko 3
Proteolyyttinen jäännösaktiivisuus prosentteina 15 minuuttia eri lämpötiloissa toteutetun inkuboinnin jälkeen

Lämpötila (°C)	P46	P415
20	100	100
30	100	100
40	100	100
45	100	96,9
50	90,9	76,4
55	57,3	1,9
60	2,3	<0,2
65	<0,2	<0,2

Bacillus-proteaasien pH-optimin määrittämiseksi aktiivisuus mitattiin eri pH-arvoissa. pH-arvon säätämiseen käytettiin pH-alueella 5-7 fosfaattipuskuria (0,1 M), pH-alueella 7,0-9,0 Tris-HCl-puskuria (0,1 M) ja pH-alueella 9,0-13,0 glysiini-NaOH-puskuria (0,1 M). Tästä aktiivisuusmäärityksestä saadut arvot on esitetty taulukossa 4 ja kuvioissa 5 ja 6.

Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP46)-kannasta saadun alkalisen proteaasin P46 pH-optimi on 10,9. pH-arvossa 12,5 aktiivisuus on vielä >80 % (kuvio 5).

Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP415)-kannasta saadun alkalisen proteaasin P415 pH-optimi on noin 8,6 (kuvio 6).

Taulukko 4
Proteaasiaktiivisuuden (%) riippuvuus pH-arvosta

Alkalinen proteaasi	pH 5,0	5,8	6,8	7,2	8,6	9,8	10,6	10,9	12,5
P46	0	14	36	41	72	82	95	100	81
P415	2	16	79	87	100	81	65	50	10

pH-stabiilisuuden tutkimiseksi proteaaseja inkuboitiin 24 tunnin ajan 4 °C:n lämpötilassa puskureissa, joiden pH-arvo vaihteli. Tämän jälken määritettiin proteaasien jäännösaktiivisuus. pH-alueella 5-7,1 käytettiin fosfaattipuskuria (0,1 M), pH-alueella 7,1-9,0 käytettiin Tris-HCl-puskuria [Tris(hydroksimetyyli)aminometaani-puskuri] (0,1 M) ja pH-alueella 9,0-12,1 käytettiin glysiini-natriumhydroksidi-puskuria (0,1 M). Saadut tulokset on esitetty kuvioissa 7 ja 8.

Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP46)-kannasta saatu alkalinen proteaasi P46 on jokseenkin stabiili pH-alueella 5,8-9,7 ja täysin stabiili pH-alueella 9,7-10,8; sen jälkeen, kun tätä proteaasia on pidetty 24 tuntia pH-arvossa 12,06, jäännösaktiivisuudeksi saadaan vielä 34 % (kuvio 7).

Bacillus pumilus DSM 5777 (pPP415)-kannasta saatu alkalinen proteaasi P415 on täysin stabiili pH-alueella 5,8-10,4 ja jokseenkin stabiili pH-alueella 10,4-10,8 (kuvio 8).

Esimerkki 6
Proteaasin 46 pesuteho

Keksinnön mukaisen proteaasin P46 vaikutus selvitettiin pesukokeissa.

Esimerkki 6a

Keksinnön mukaisen proteaasin käyttämiseksi lisäaineena pesuaineissa sen pesuteho määritettiin pesukokeissa käyttäen EY-PC-koekudosta (munankeltuainen/vesiväri-lika polyesteri-puuvillasekoitekankaalla, oma valmiste) laboratoriopesukoneissa (tyyppi: Polycolor). Tätä tarkoitusta varten koekudos pestiin pesuaineperusvalmisteella, jota käytettiin 6 g/l, ja jonka koostumus oli 18,4 % zeoliittia, 7,3 % Na_2CO_3, 4,8 % lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia, 3,3 % ei-ionisia aineita, 3,3 % saippuaa, 0,1 % vaahdonestoainetta, 1,5 % karboksimetyyliselluloosaa, 0,15 % optisia kirkasteita, 3,5 % natrium-di-silikaattia, 25 % perboraattia, 1,5 % TAED ja 30,85 % Na_2SO_4, ja johon

lisättiin keksinnön mukaista proteaasia (5000 DU/litra) vedessä, jonka kovuus oli 15 °dH. Pesuliuoksen pH oli 10,3. Pesu tapahtui lämpötila-alueella 15-60 °C 45 minuutin ajan (2 °C/min; pitoaika 22,5 min.)

Entsyymipitoinen pesuaineliuos vaikutti koekudokseen pyöriväs-sä näyteastiassa, jonka lämpötilaa säädettiin vesihauteen avulla edellä mainitun lämpötilaohjelman mukaisesti. Pesuvaiheen jälkeen koekudos huuhdottiin kahdesti vesijohtovedellä ja sitten se silitettiin.

Pesuteho määritettiin mittaamalla pestyn koekudoksen heijastus. Entsyymin aikaansaama pesuteho todetaan entsyymipitoisella pesuaineella pestyn koekudoksen paremmasta heijastuskyvystä. Pelkällä pesuaineperusvalmisteella pestyn koekudoksen tapauksessa koekudoksen heijastusarvoksi saatiin 41. Kun pesuaineperusvalmisteeseen lisättiin keksinnön mukaista proteaasia P46, niin koekudoksen heijastuskyvylle saatiin selvästi suurempi arvo eli 45.

Esimerkki 6b

Keksinnön mukaisen proteaasin P46 pesuteho määritettiin esimerkissä 6a kuvatulla tavalla. Pesuaineperusvalmisteena käytettiin kaupallisesti saatavaa jauhemaista täyspesuainetta (pH 10,4). Tämän pesuaineperusvalmisteen tapauksessa koekudoksen heijastusarvoksi saatiin 41. Kun pesuaineperusvalmisteeseen lisättiin keksinnön mukaista proteaasia P46, niin koekudoksen heijastuskyvylle saatiin selvästi suurempi arvo eli 48.

Esimerkki 6c

Keksinnön mukaisen proteaasin P46 pesuteho määritettiin esimerkissä 6b kuvatulla tavalla. Koekudoksena käytettiin kuitenkin verellä, maidolla ja vesivärillä liattua polyesteri-puuvilla-sekoitekangasta (EMPA 117 - saatu sveitsiläisestä aineenkoetuslaitoksesta Eidgenössische Materialprüfungsanstalt, St.

Gallen, Sveitsi). Pesuaineperusvalmisteena käytettiin, määränä 4 g/l, kaupallisesti saatavaa nestemäistä pesuainetta (pH 7,5). Pesu tapahtui lämpötila-alueella 15-40 °C (2 °C/min; pitoaika 22,5 min.)

Kun keksinnön mukaista proteaasia P46 ei lisätty, niin pestyn koekudoksen heijastusarvoksi saatiin 50, kun taas keksinnön mukaista proteaasia P46 lisäten pestyn koekudoksen heijastusarvoksi saatiin 62.

Esimerkki 6d

Keksinnön mukaisen proteaasin P46 pesuteho määritettiin esimerkissä 6c kuvatulla tavalla. Koekudoksena käytettiin kuitenkin munankeltuaisella ja vesivärillä liattua polyesteri-puuvilla-sekoitekangasta.

Kun keksinnön mukaista proteaasia P46 ei lisätty, niin pestyn koekudoksen heijastusarvoksi saatiin 41, kun taas keksinnön mukaista proteaasia P46 lisäten pestyn koekudoksen heijastusarvoksi saatiin 45.

Esimerkki 6e

Keksinnön mukaisen proteaasin P46 pesuteho määritettiin esimerkissä 6d kuvatulla tavalla. Koekudoksena käytettiin kuitenkin maidolla ja vesivärillä liattua polyesteri-puuvilla-sekoitekangasta.

Kun keksinnön mukaista proteaasia P46 ei lisätty, niin pestyn koekudoksen heijastusarvoksi saatiin 45, kun taas keksinnön mukaista proteaasia P46 lisäten pestyn koekudoksen heijastusarvoksi saatiin 52.

Esimerkeissä 6a - 6e saadut tulokset osoittavat keksinnön mukaisen proteaasin erinomaisen pesutehon. Koekudoksen, jonka pesemiseen käytettyyn pesuaineperusvalmisteeseen on lisätty keksinnön mukaista proteaasia, heijastuskyky on selvästi suu-

rempi, mikä osoittaa keksinnön mukaisen proteaasin P46 hyvän pesutehon. Mitä erilaisimmat proteiiniliat saadaan poistumaan kudoksesta erinomaisella tavalla proteaasin P46 avulla.

Esimerkki 7
Proteaasin P415 pesuteho

Keksinnön mukaisen proteaasin P415 pesuteho määritettiin samalla tavalla kuin esimerkissä 6 proteaasin P46 tapauksessa.

Esimerkki 7a
Tässä esimerkissä selvitettiin pesutehon riippuvuus entsyymin annostuksesta (DU/ml) kahta erilaista koekudosta käyttäen (M-PC = maito/vesiväri-lika polyesteri-puuvilla-sekoitekankaalla; EY-PC = munanvalkuainen/vesiväri-lika polyesteri-puuvilla-sekoitekankaalla). Pesuaineperusvalmisteena käytettiin kaupallisesti saatavaa eurooppalaista nestemäistä pesuainetta. Pestyn koekudoksen heijastuskyky määritettiin esimerkissä 6 kuvatulla tavalla. Näistä pesukokeista saadut tulokset on esitetty kuviossa 9 (M-PC) ja kuviossa 10 (EY-PC), joissa on esitetty keksinnön mukaista proteaasia P415 lisäämällä pestyn koekudoksen heijastuskyvyn ja ilman proteaasia P415 pestyn koekudoksen heijastuskyvyn välisen eron riippuvuus entsyymin annostuksesta.

Esimerkki 7d

Keksinnön mukaisen proteaasin P415 pesuteho määritettiin esimerkissä 7a kuvatulla tavalla. Pesuaineperusvalmisteena käytettiin kuitenkin kaupallisesti saatavaa eurooppalaista pesuainetiivistettä (pH 10,3). Annostus oli 3 g/l. Pesukokeen tulokset on esitetty kuviossa 11 heijastuserojen riippuvuutena entsyymin annostuksesta.

Esimerkkien 7a ja 7b tulokset osoittavat keksinnön mukaisen proteaasin P415 erinomaisen pesutehon siten, että jopa pienil-

lä annoksilla voitiin saavuttaa erittäin hyvä pesuteho. Mitä erilaisimmat proteiiniliat saadaan poistetuiksi erinomaisella tavalla kankaista käyttämällä pesuvaiheessa proteaasia P415.

Patenttivaatimukset

1. Alkaliset Bacillus-proteaasit, t u n n e t t u siitä, että niiden pH-optimi on noin pH-alueella 8,0-11,5 ja niiden lämpötilaoptimi on noin alueella 50-60 °C, ja että niitä saadaan viljelemällä Bacillus pumilus DSM 5777-kantaa tai transformoitua, tätä proteaasia vastaavan geneettisen informaation sisältävää mikro-organismia.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen alkalinen Bacillus-proteaasi, t u n n e t t u siitä, että sillä on seuraavat ominaisuudet:

(1) vaikutus: se pilkkoo proteiineja ja peptidejä;
(2) pH-optimi: noin pH-alueella 10,5-11,0;
(3) pH-stabiilisuus: nämä entsyymit ovat täysin stabiileja pH-alueella 9,7-10,8;
(4) lämpötilaoptimi: noin 60 °C;
(5) lämpötilastabiilisuus: proteaasin inkubointi korkeintaan 45 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan ei heikennä olennaisesti sen aktiivisuutta; sen jälkeen, kun proteaasia on inkuboitu 15 minuutin ajan 50 °C:ssa, sen jäännösaktiivisuus on vähintään 90 %.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen alkalinen Bacillus-proteaasi, t u n n e t t u siitä, että sillä on seuraavat ominaisuudet:

(1) vaikutus: se pilkkoo proteiineja ja peptidejä;
(2) pH-optimi: noin pH-alueella 8,5-9;
(3) pH-stabiilisuus: nämä entsyymit ovat täysin stabiileja pH-alueella 5,5-10,5;
(4) lämpötilaoptimi: noin 50 °C;
(5) lämpötilastabiilisuus: proteaasin inkubointi korkeintaan 40 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan ei heikennä olennaisesti sen aktiivisuutta; sen jälkeen, kun proteaasia on inkuboitu 15 minuutin ajan 45 °C:ssa, sen jäännösaktiivisuus on vähintään 95 %.

4. Koostumukset pesu-, puhdistus- tai astianpesusovellutuksia varten, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaista alkalista Bacillus-proteaasia.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukaiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät alkalista Bacillus-proteaasia yhdessä yhden tai useamman, pesu- ja puhdistusaineissa tavallisen, proteaasien, lipaasien, pektinaatien, amylaasien, nukleaasien, oksidoreduktaasien ja sellulasien joukosta valittun entsyymin kanssa.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukaiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät alkalista Bacillus-proteaasia yhdessä toisen proteaasin kanssa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukaiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät yhdistelmänä kahta jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaista alkalista Bacillus-proteaasia.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukaiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät yhdistelmänä patenttivaatimuksen 2 mukaista alkalista Bacillus-proteaasia ja patenttivaatimuksen 3 mukaista Bacillus-proteaasia.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 4-8 mukaiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät alkalista Bacillus-proteaasia valmisteessa, joka on tarkoitettu matalia, korkeintaan noin 60 °C olevia käyttölämpötiloja varten.

10. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaisten alkalisten Bacillus-proteaasien valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että tässä menetelmässä viljellään Bacillus pumilus DSM 5777-kantaa tai jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaisia proteaaseja vastaavan geneettisen informaation sisältävää mikro-organismia, minkä jälkeen muodostunut alkalinen proteaasi eristetään viljelmän supernatantista.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty mikro-organismi on Bacillus subtilis tai Bacillus alcalophilus tai Bacillus licheniformis tai Bacillus amyloliquefaciens tai Bacillus pumilus.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä käytetään mikro-organismia, joka sisältää geneettisen informaation ilmentämisvektorissa.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ilmentämisvektori on plasmidi, joka voidaan eristää talletusnumerolla DSM 6879 talletetusta mikro-organismista tai talletusnumerolla DSM 6880 talletetusta mikro-organismista.

14. Talletusnumeroilla DSM 6879 ja DSM 6880 talletetut mikro-organismit.

15. Plasmidi, t u n n e t t u siitä, että se voidaan eristää talletusnumerolla DSM 6879 talletetusta mikro-organismista, ja että se sisältää geneettisen informaation patenttivaatimuksen 2 mukaista proteaasia varten.

16. Plasmidi, t u n n e t t u siitä, että se voidaan eristää talletusnumerolla DSM 6880 talletetusta mikro-organismista, ja että se sisältää geneettisen informaation patenttivaatimuksen 3 mukaista proteaasia varten.

Fig. 1

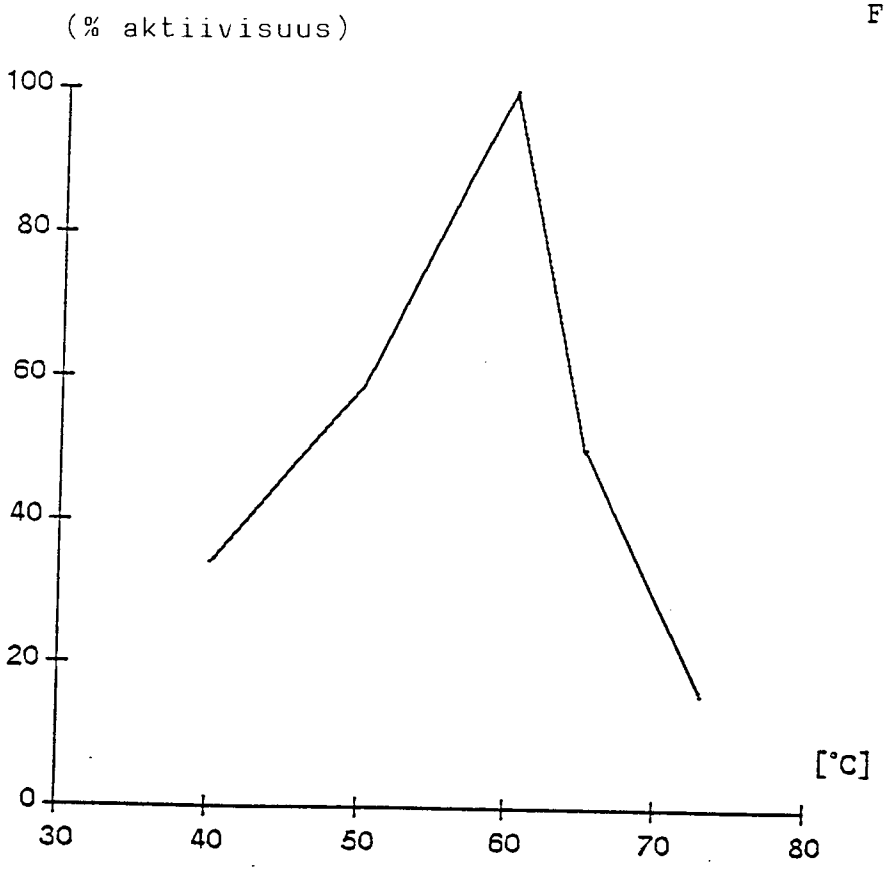


Fig. 2

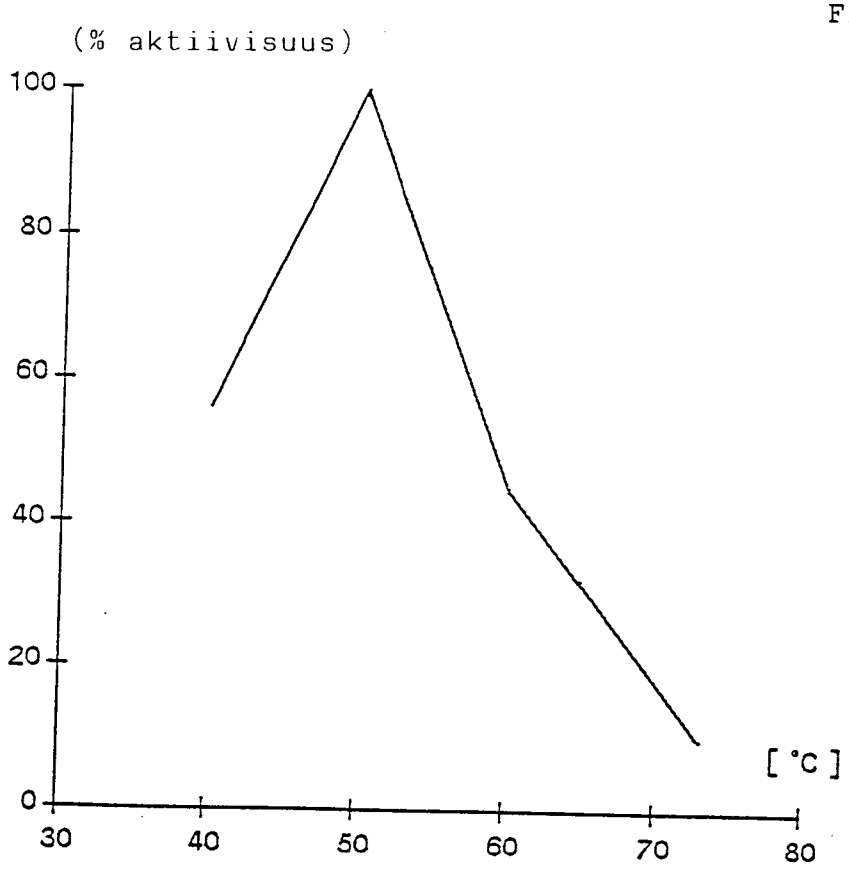


Fig. 3

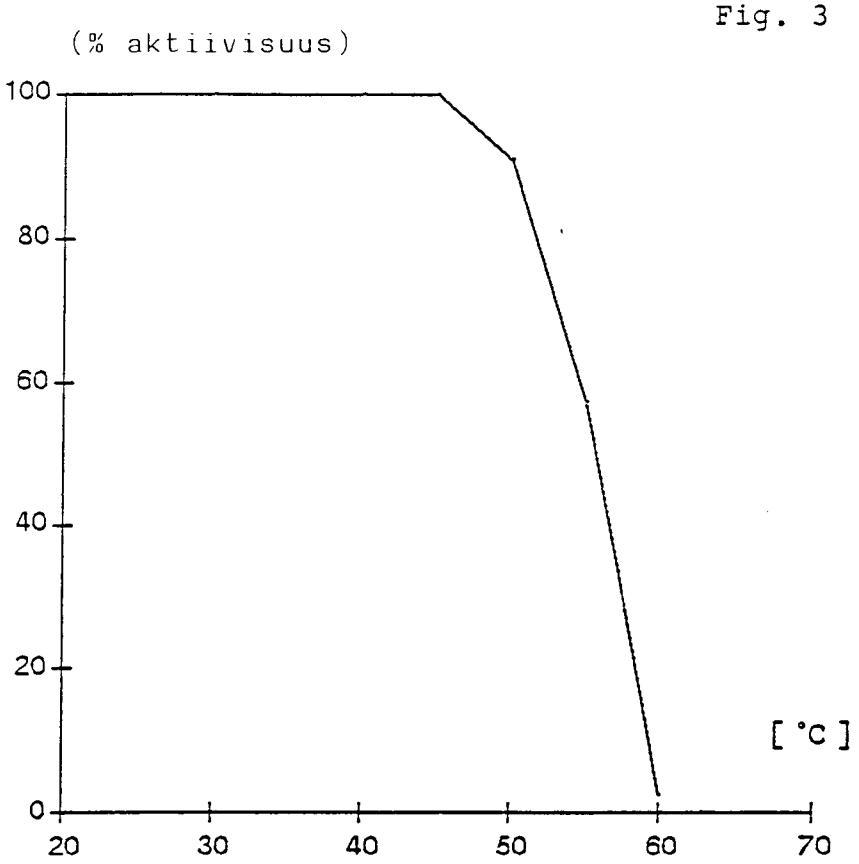


Fig. 4

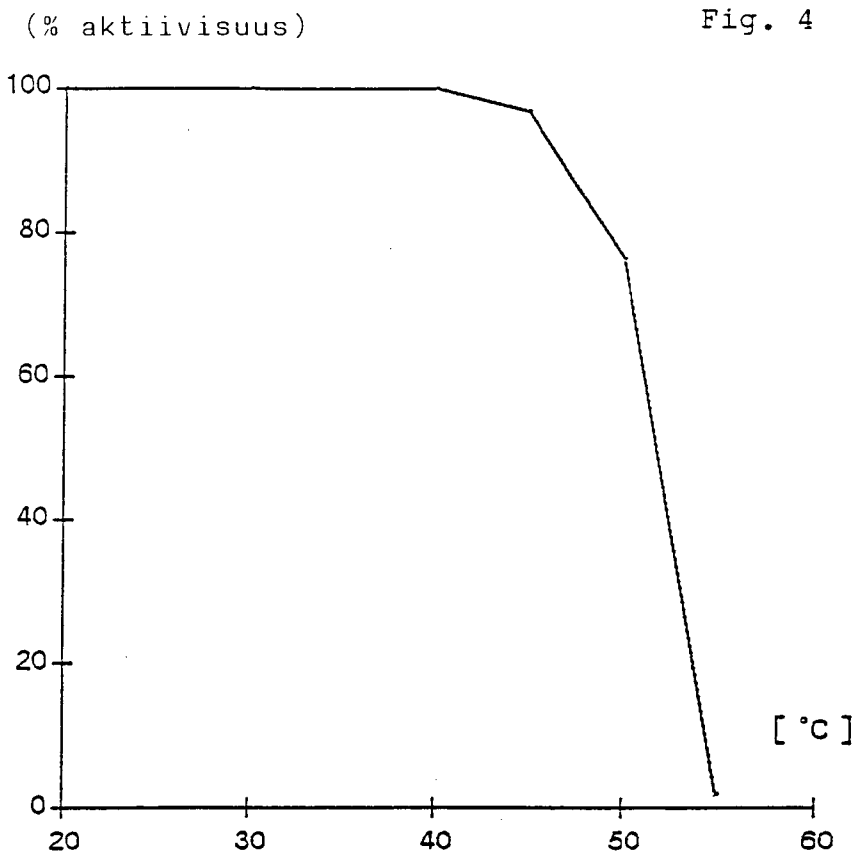


Fig. 5

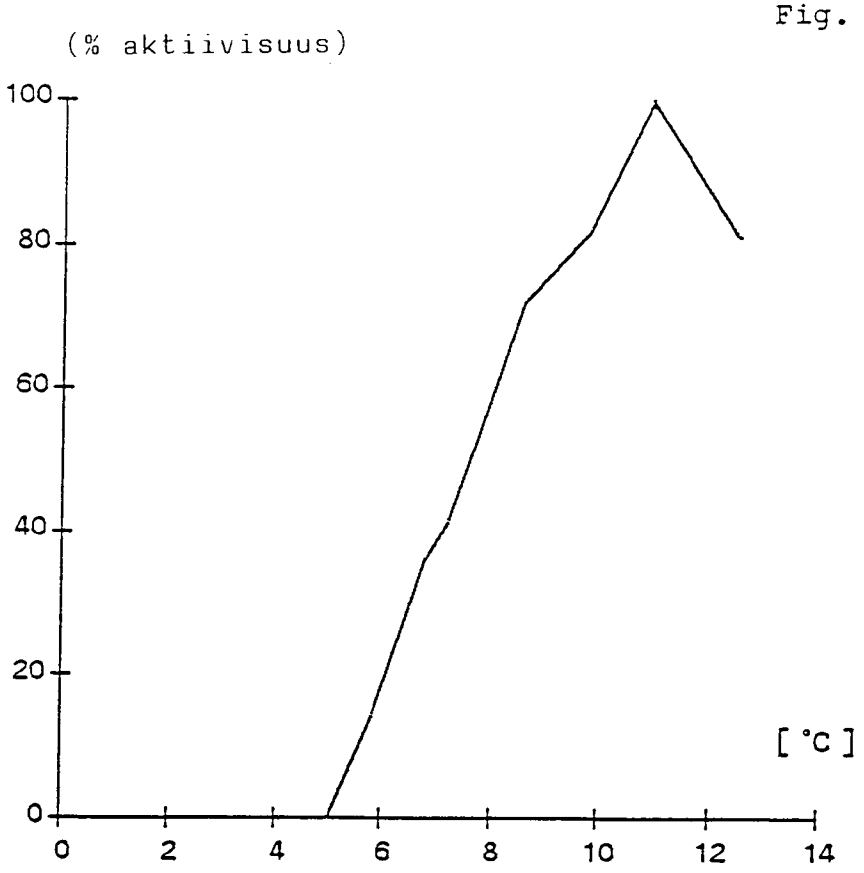


Fig. 6

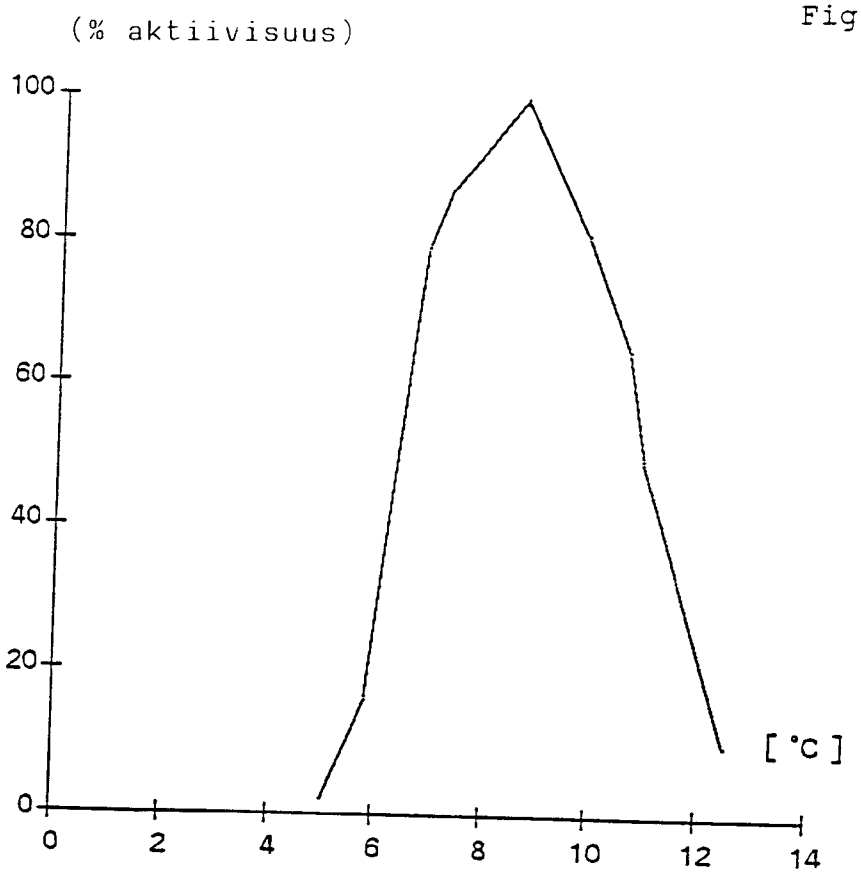


Fig. 7

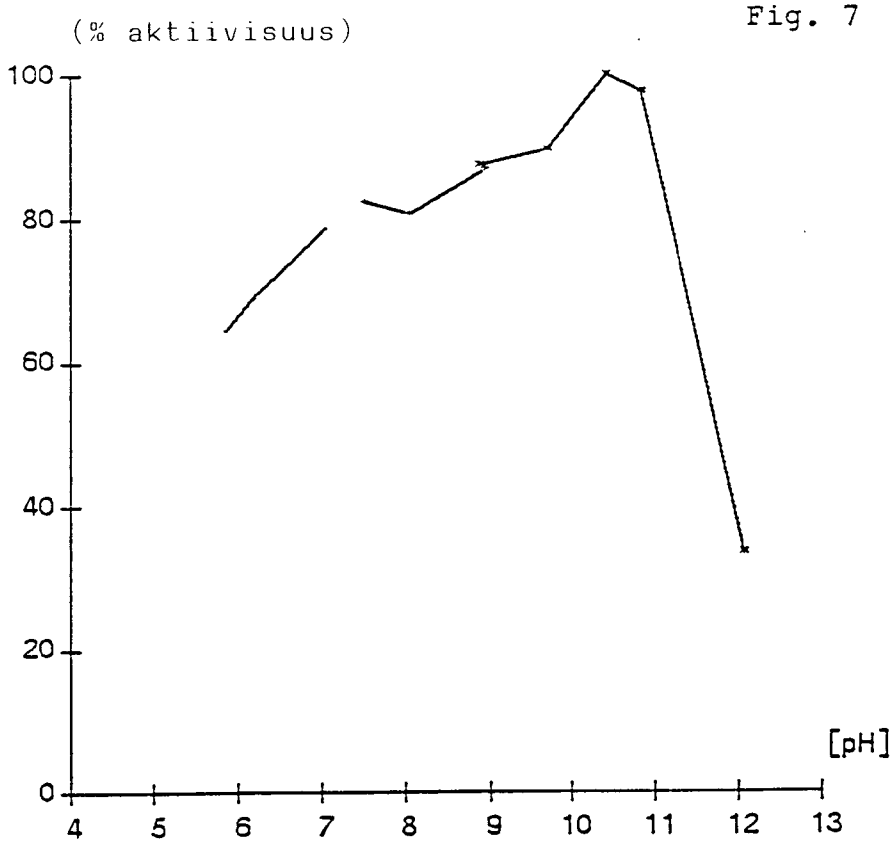


Fig. 8

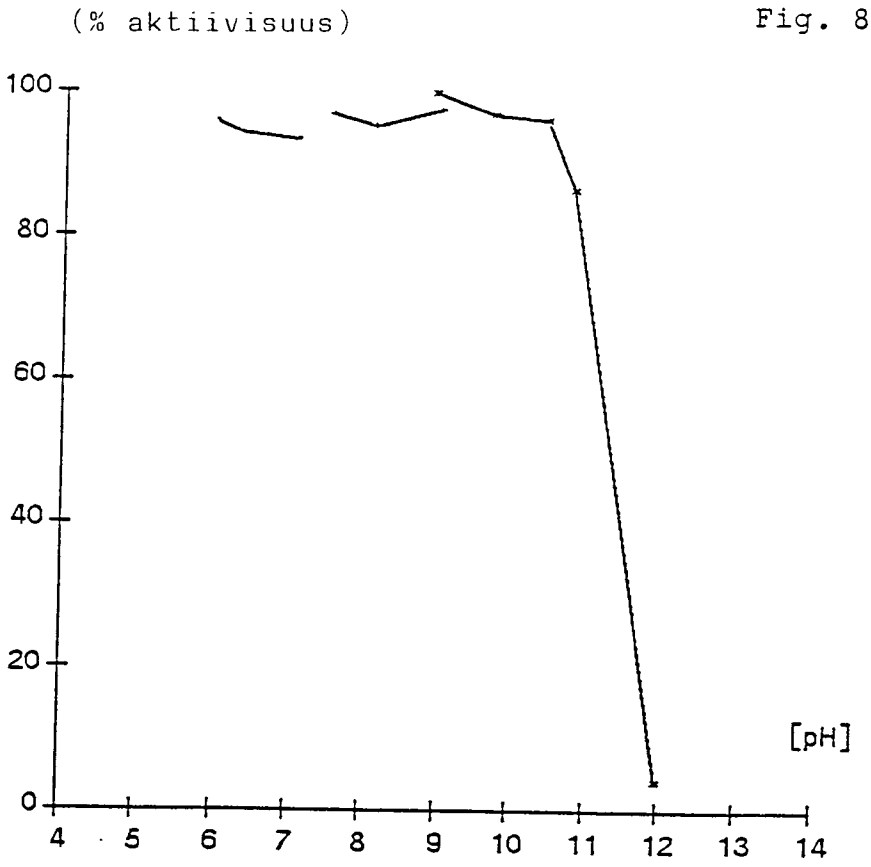


Fig. 9

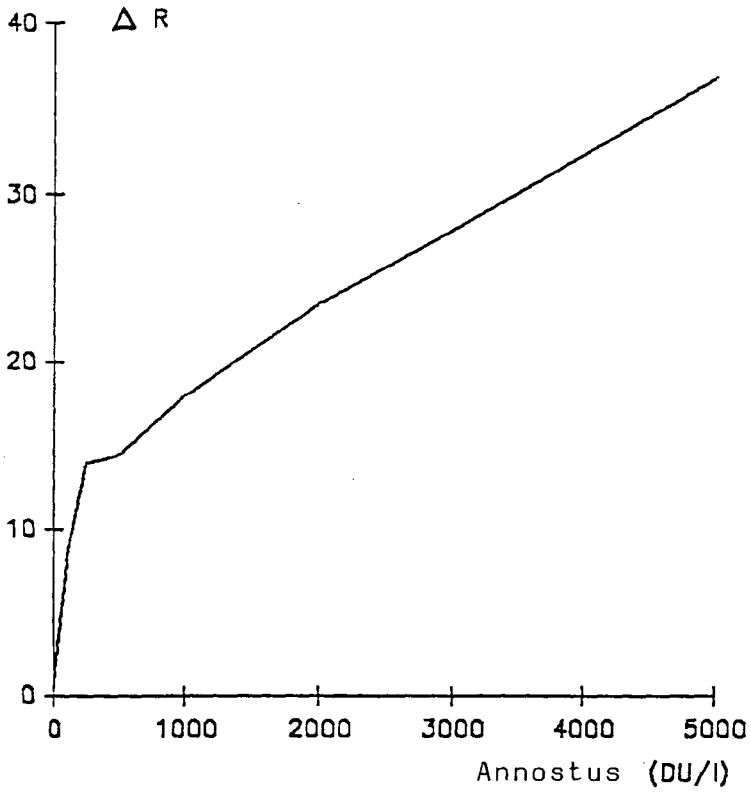


Fig. 10

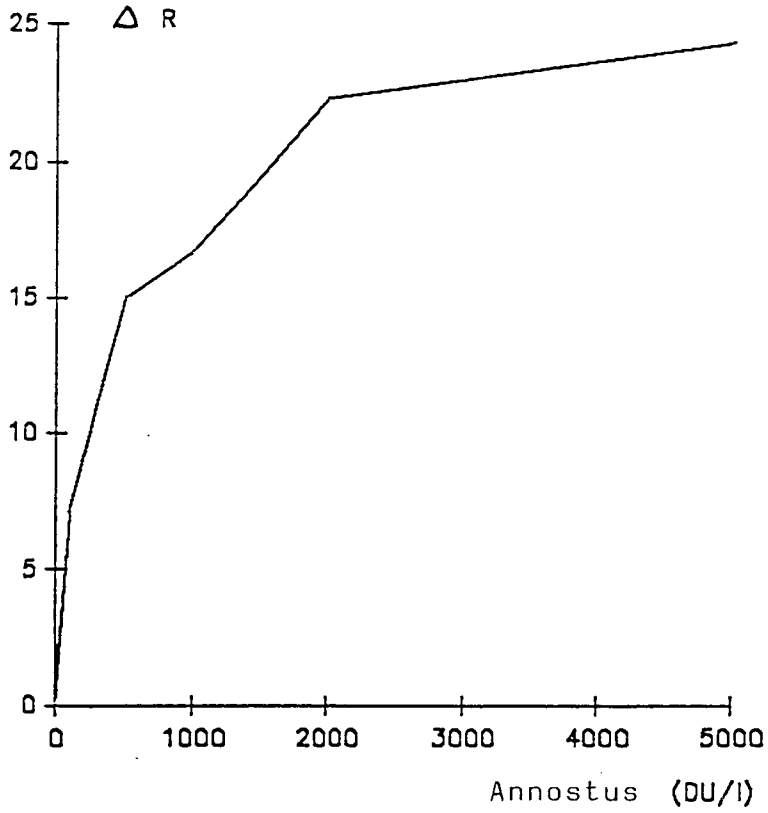
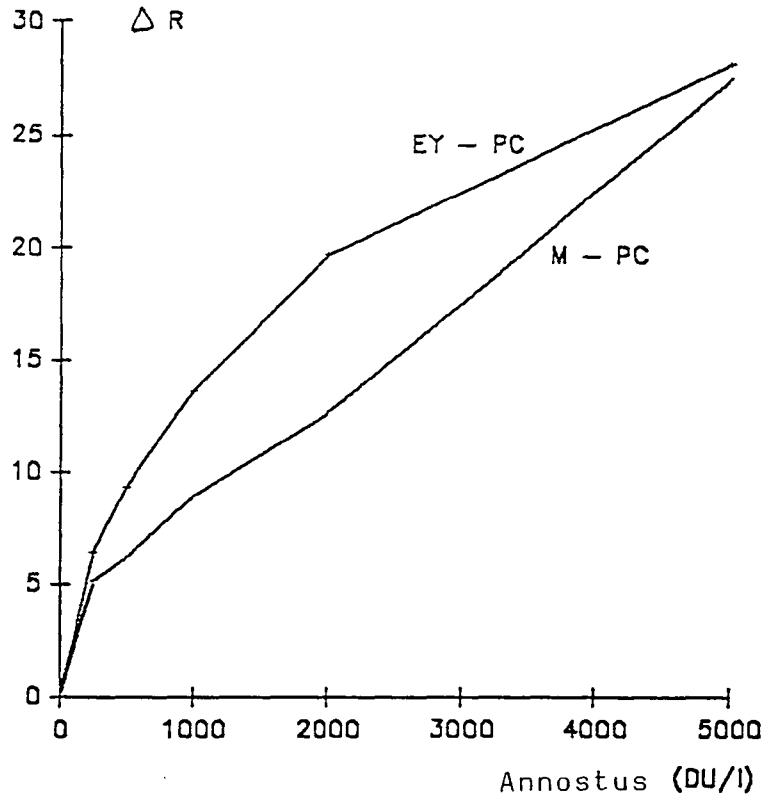


Fig. 11


30
25
20
15
10
5
0
Δ R
EY – PC
M – PC
0
1000
2000
3000
4000
5000
Annostus (DU/l)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS **TUTKIMUSRAPORTTI**

Patentti- ja innovaatiolinja

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
932538	C12N 9/54, 9/56, 1/21, 15/75, C11D 3/386
	// (C12N 1/21, C12R 1:07) ☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO
Patenttivirastojen julkaisut FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US:
☐ jatkuu kääntöpuolella
Muu aineisto
☐ jatkuu kääntöpuolella

VIITEJULKAISUT

Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
	Biosis An: PREV199192009219, Qiu X. et al., Studies on Alkaline Proteinase from Alkaliphilic Bacillus-pumilus III. Some Properties and Application, Acta Microbiologica Sinica, Vol. 30, Nr 6, 1990, s. 445-449. Biosis An: Prev197662060151, Fermentative Production Of Alkaline Proteinase By Bacillus-pumilus Strain 209 and Some Properties of the Enzyme, Acta Microbiologica Sinica, Vol. 15, Nr. 4, 1975, s. 330-334. WPI An: 1986-112132, tiivistelmä julkaisusta SU1183538 A, As Kaza Virus Micro & Karag Karbid Prodn Co, Bacterial Strain Bacillus Pumilus 153 - Is Useful In Removing Crotonic Aldehyde From Aq. Effluents. WPI An: 1989-160751, tiivistelmä julkaisusta JP1101886 A, Mitsubishi Gas Chem Co Inc, New Recombinant DNA - Contains Alkali Protease Gene of Bacillus Pumilus Integrated into Vector DNA. Biosis An: Prev199191015259, Qiu X. et al., Study on Alkaline Proteinase from Alkaliphilic Bacillus-pumilus II. Research on the Selection of High Producing Strain and the Conditions for Enzyme Production, Acta Microbiologica Sinica, Vol. 30, Nr 2, 1990, s. 129-133. Biosis An: Prev198478094799, Qiu X. et al., A Study of the Purification and Some Properties of Alkaline Proteinase from Bacillus-pumilus Strain 209, Acta Microbiologica Sinica, Vol. 24, Nr. 1, 1984, s. 66-73. DK 158523 B, C12N 9/54, Showa Denko Kabushiki Kaisha.	

5.1.2002 Pekka