



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3501/83

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 9/54

(22) Indleveringsdag: 29 jul 1983

(41) Alm. tilgængelig: 30 jan 1985

(44) Fremlagt: 28 maj 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *SHOWA DENKO KABUSHIKI KAISHA; 13-9, Shiba Daimon 1-chome; Minato-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Eiji *Ichishima; JP, Takashi *Onouchi; JP

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Alkalisk protease og fremgangsmåde til fremstilling deraf

(56) Fremdragne publikationer

ved en elektrofokuseringsmetode, en absorptionsspid på 275-282 nm i et UV-absorptionsspektrum, IR-absorptionskarakteristika som vist i Fig. 5 og en serinrest i det aktive sted derfor.

Denne alkaliske protease fremstilles ved at dyrke arten NKS-21 tilhørende slægten *Bacillus*.

(57) Sammen drag:

3501-83

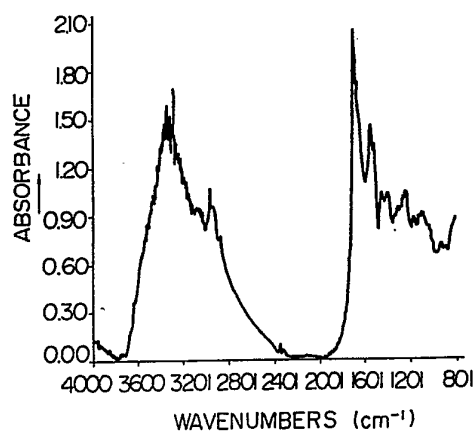
En alkalisk protease API-21 har følgende fysisk-kemiske egenskaber:

1) Aktivitet: hydrolyserer casein under basiske betingelser, har et optimalt pH-område på 10-11 og et optimalt temperaturområde for aktivitet på 45-50°C,

2) Stabilitet: ingen nedgang i enzymaktivitet iagttages ved opvarmning op til 40°C uden substrat i 10 minutter ved en pH-værdi på 10, men der iagttages en nedgang i enzymaktivitet på 90% eller mere ved opvarmning til 50°C i 10 minutter ved en pH-værdi på 10. Deaktivering forekommer ved opvarmning til 50°C i 10 minutter ved en pH-værdi på 8, og fuldstændig deaktivering opstår ved opvarmning til 60°C i 10 minutter ved en pH-værdi på 8. Proteasen er stabil under basiske betingelser, især i et pH-område på 7-11,5, og er stabil over for frysning og frysetørring; og

3) Enzymmolekyle: proteasen er et protein med en molekylvægt på ca. 22.000 bedømt ved gelfiltrering, et isoelektrisk punkt på 7,4 bedømt

Fig. 5 3501-83



Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt alkalisk protease betegnet API-21 og en fremgangsmåde til fremstilling deraf.

Alkalisk protease anvendes i betydeligt omfang inden for forskellige områder såsom læderindustrien, levnedsmiddelindustrien, fiber- eller tekstilindustrien, eller lægemiddelindustrien eller den farmaceutiske industri, fordi alkalisk protease er temmelig stabil over for varme sammenlignet med neutral protease. Endvidere er efterspørgslen efter enzymer som tilsætningsstof til detergenter for nylig blevet forøget. Enzymer, som i praksis anvendes som tilsætningsstof til detergenter, er alkaliske proteaser, som stammer fra bakterier tilhørende slægten *Bacillus*, der har en maksimumaktivitet ved en pH-værdi på ca. 9-10. De fleste af de ovennævnte enzymer har en maksimumaktivitet ved en relativt høj temperatur, især ca. 60°C, men er inaktive eller mindre aktive ved en relativt lav temperatur, især ca. stuetemperatur. Dette betyder, at enzymernes karakteristika ikke fuldt ud udnyttes i et land som Japan, hvor tøj sædvanligvis vaskes ved stuetemperatur. Endvidere er der behov for udviklingen af enzymer med bevaret enzymaktivitet selv ved en relativt lav temperatur som følge af den forøgede anvendelse af kemiske fibre til tøj med en relativt lav var- mestabilitet og som følge af den for nyligt opståede energisparebevægelse.

Formålet med den foreliggende opfindelse er følgelig at eliminere de ovennævnte ulemper ved de kendte alkaliske proteaser ved at tilvejebringe en hidtil ukendt alkalisk protease med en høj enzymaktivitet ved relativt lav temperatur og en fremgangsmåde til fremstilling heraf.

Den alkaliske protease API-21 ifølge opfindelsen er ejendommelig ved,

a) at den har en optimal proteolytisk aktivitet ved en pH-værdi på 10-11 og ved en temperatur på 45-50°C, idet aktiviteten måles over for casein,

b) at den er et protein med en molekylvægt på ca. 22.000 bedømt ved en gelfiltreringsmetode, et isoelektrisk punkt på 7,4, bedømt ved en

elektrofokuseringsmetode, en absorptionsspids på 275-282 nm i et UV-absorptionsspektrum, IR-absorptionskarakteristika som vist i fig. 5, og har en serinrest i det aktive sted,

c) at den har følgende aminosyresammensætning:

5	lysin	4
	histidin	8
	arginin	8
	tryptophan	0
	asparaginsyre/asparagin	27
10	threonin	10
	serin	17
	glutaminsyre/glutamin	14
	prolin	7
	glycin	30
15	alanin	26
	valin	20
	methionin	4
	isoleucin	10
	leucin	14
20	tyrosin	12
	phenylalanin	4
	cystein/cystin	0

og

d) at den er identisk med den protease, der dannes ved aerob dyrkning af *Bacillus*-stammen deponeret under nr. FERM BP-93 i et egnet basisk dyrkningsmedium.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at en stamme af arten NKS-21, for hvilken stammen *Bacillus* FERM BP-93 er type-stammen, dyrkes i et egnet basisk dyrkningsmedium, hvorpå den alkaliske protease API-21 udvindes fra det dyrkede produkt.

30

Opfindelsen belyses nærmere under henvisning til tegningen, hvor fig. 1 grafisk viser det optimale pH-område for enzymet ifølge opfindelsen,

- fig. 2 grafisk viser stabiliteten, hvad angår pH, af enzymet ifølge opfindelsen uden substrat,
fig. 3 grafisk viser det aktive temperaturområde og den optimale temperatur for enzymet ifølge opfindelsen,
5 fig. 4A og 4B grafisk viser stabiliteten, hvad angår temperatur, af enzymet ifølge opfindelsen uden substrat ved en pH-værdi på henholdsvis 10 og 8, og
fig. 5 viser Fourier-transformations infrarødt spektrum for enzymet ifølge opfindelsen.

- 10 Stammen *Bacillus* FERM BP-93, som tilhører arten *Bacillus* sp. nov. NKS-21 (i det følgende benævnt NKS-21), der kan danne alkalisk protease med en høj aktivitet ved en relativt lav temperatur, blev isoleret fra en jordprøve ved Fuchu-shi, Tokyo, Japan. Ud fra de mikrobiologiske egenskaber har det vist sig, at den er en hidtil ukendt aerob sporangiumbakterie tilhørende slægten *Bacillus*.

- 15 Denne bakterie NKS-21 er den 3. februar 1982 blevet deponeret hos Fermentation Research Institute (FRI) i Japan i henhold til Budapest-traktaten som *Bacillus* nr. FERM BP-93.

- 20 Denne bakteries mikrobiologiske egenskaber er angivet nedenfor. De reagenser og isolationsmetoder, der blev anvendt til bestemmelse af de mikrobiologiske egenskaber af bakterien NKS-21, var som beskrevet i *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8. udgave, 1974. Isolationen af bakterien fra jordprøven blev udført som følger: en lille mængde af en jordmasse blev sat til et peptonmedium, og dyrkningen blev udført i en rystedyrkningsbeholder ved en pH-værdi på 7-10 og
25 en temperatur på 10-40°C i 40-150 timer. En portion af de dyrkede produkter blev udbredt på agarplader, og stammen blev isoleret ved en sædvanlig reniseringsmetode.

Mikrobielle egenskaber af NKS-21

a) Morfologiske karakteristika

1) Størrelse af vegetative celler:

0,6-0,8 μm $\times$ 2,5-3,5 μm

- 2) Cellepleomorfisme:
Cellerne udvider sig undertiden til en størrelse på 0,6-1,0 $\mu\text{m} \times 4,5 \mu\text{m}$.
- 3) Gramfarvning
Positiv, men affarves let.
- 4) Bevægelighed:
Bevægelige med flageller fordelt over hele cellens overflade.
- 5) Sporer:
Ovale til ellipseformede, subterminale, 0,8 $\mu\text{m} \times 1,2 \mu\text{m}$.
- 6) Sporangier:
Lettene opsvulmede.
- 7) Syreresistens:
Negativ.

15 b) Dyrkningskarakteristika i forskellige medier

- 1) Peptonvæske
- i) pH-værdi 9,5:
God vækst både ved 20°C og 30°C.
pH-værdi 7,2:
Ring vækst ved 20°C og god vækst ved 30°C.
- ii) Væksttemperatur ved pH-værdi på 9,5:
Vækst mellem 14°C og 41°C.
Ingen vækst over 43°C eller under 12°C.

- 2) Andre medier:
- Kødekstrakt/peptonkråagar: god vækst

Kødekstrakt/peptonvæske indeholdende 7% natriumchlorid: god vækst

Kødekstrakt/peptonvæske: god vækst

Casein/kødekstrakt/peptonskråagar: god vækst

Casein/kødekstrakt/peptonvæske: god vækst

Stivelse/peptonvæske: god vækst

5 Glucose/peptonvæske: god vækst

Trypton/gærekstrakt/agarplade: god vækst

Stivelse/gærekstraktvæske: vækst

Kødekstrakt/gelatinestik:

- 10 i) pH-værdi 10,0, 30°C: vækst og smeltning.
ii) pH-værdi 10,0, 20°C: svag overfladevækst og svag smeltning.
iii) pH-værdi 7,2, 30°C: vækst og smeltning.
iv) pH-værdi 7,2, 20°C: svag overfladevækst og svag smeltning.
- 15 3) Vækst under anaerobe betingelser:
Ingen vækst under anaerobe betingelser, men vækst under aerobe betingelser.

c) Fysiologiske karakteristika

- 20 1) Reduktion af nitrat til nitrit:
Ingen reduktion.
- 2) Anaerob dannelse af gas ud fra nitrat:
Negativ.
- 3) Methylrød (MR)-test:
Negativ.

- 4) Voges-Proskauer (VP)-test:
Negativ.
- 5) Dannelse af indol:
Ingen.
- 5 6) Dannelse af H_2S :
Ingen.
- 7) Hydrolyse af stivelse:
Positiv.
- 8) Udnyttelse af citrat:
10 Positiv.
- 9) Udnyttelse af uorganisk nitrogenkilde:
Udnytter nitrater og ammoniumsalte.
- 10) Dannelse af pigment:
Ingen.
- 15 11) Ureasetest:
Negativ.
- 12) Cytochromoxidasetest:
Positiv.
- 13) Catalasetest:
20 Positiv.
- 14) O-F-test (Hugh og Leifson's medium):
Svag fermentering.
- 15) Syredannelse og gasdannelse ud fra carbonhydrater:

		Syredannelse	Gasdannelse
25	L-Arabinose	-	-
	D-Xylose	-	-
	D-Glucose	+	-
	D-Mannose	+	-
	D-Fructose	-	-
30	D-Galactose	+	-
	Maltose	+	-
	Saccharose	+	-
	Lactose	-	-
	Trehalose	+	-
35	D-Sorbitol	+	-

	D-Mannitol	+	-
	Inositol	+	-
	Glycerol	+	-
	Stivelse	+	-
5	Ribose	-	-
	Raffinose	+	-
	Cellobiose	+	-

(Bemærkninger: +: positiv, -: negativ)

16) Andre:

- | | | | |
|----|------|------------------------------|----------|
| 10 | i) | Deaminering af phenylalanin: | positiv. |
| | ii) | Hydrolyse af casein: | positiv. |
| | iii) | Nedbrydning af tyrosin: | positiv. |

Som vist ovenfor er stammen NKS-21 en aerob sporangiumbakterie, som klart tilhører slægten *Bacillus*. De karakteristiske træk ved denne stamme er, at stammen vokser i et neutralt til basisk medium, og at det optimale pH-område for vækst er 8-10. Disse mikrobiologiske egenskaber ligner egenskaberne ved de kendte stammer *Bacillus pasteurii* og *Bacillus alcalophilus*. Stammen NKS-21 adskiller sig imidlertid klart fra de to ovennævnte stammer med hensyn til visse mikrobiologiske egenskaber, selv om nogle mikrobiologiske egenskaber ved stammen NKS-21 er de samme som for de ovennævnte kendte stammer. Fx vokser både stammen *Bacillus pasteurii* og *Bacillus alcalophilus* i det basiske pH-område, men den sidstnævnte kan ikke vokse ved en pH-værdi på 7. I modsætning hertil vokser NKS-21 godt i det basiske pH-område, men vokser stadigvæk godt ved neutral pH. NKS-21 adskiller sig således fra *Bacillus alcalophilus* på dette punkt. Endvidere hydrolyserer *Bacillus pasteurii* ikke stivelse, hvorimod NKS-21 hydrolyserer stivelse. Endvidere adskiller NKS-21 sig fra *Bacillus pasteurii* på følgende punkter:

- | | | |
|----|----|--|
| 30 | 1) | <i>Bacillus pasteurii</i> reducerer nitrater, hvorimod NKS-21 ikke reducerer nitrater, |
|----|----|--|

2) *Bacillus pasteurii* har kugleformede eller næsten ovale endosporer, hvorimod NKS-21's endosporer er ovale til elliptiske, og

5 3) *Bacillus pasteurii* nedbryder urinstof, hvorimod NKS-21 ikke nedbryder urinstof.

NKS-21 adskiller sig tydeligt fra *Bacillus pasteurii* på grund af de ovennævnte forskelle i mikrobiologiske egenskaber.

Klassefikationsdata for *Bacillus alcalophilus* er ikke beskrevet detaljeret i ovennævnte *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Da
10 standardstammen af *Bacillus alcalophilus* ikke var tilgængelig, blev de mikrobiologiske egenskaber ved NKS-21 sammenlignet i forsøg med egenskaberne ved de oprindelige stammer *Bacillus alcalophilus* NCIB 10.436 og NCIB 10.438, der er indført i *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Både NCIB 10.436 og NCIB 10.438 var lettere
15 positive i gramfarvningsreaktionen og blev let affarvet. Disse egenskaber ligner egenskaberne ved NKS-21. Med hensyn til de morfologiske egenskaber for de vegetative celler blev korte stave med en størrelse på $0,7 \mu\text{m} \times 2,0 \mu\text{m}$ og lange stave med en størrelse på $0,8 \mu\text{m} \times 4,6 \mu\text{m}$ iagttaget i elektronmikroskop for NCIB 10.436, og
20 vegetative celler med en størrelse på $0,7 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$ blev iagttaget for NCIB 10.438. I modsætning hertil var størrelsen af de vegetative celler af NKS-21 $0,6-0,8 \mu\text{m} \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$ ved undersøgelse under elektronmikroskop, og deres endosporer har en oval til elliptisk form med en størrelse på $0,8 \mu\text{m} \times 1,2 \mu\text{m}$. Bevægelighed blev ikke iagttaget for NCIB 10.436 og 10.438, hvorimod NKS-21 er bevægelig. End-
25 videre adskiller de fysiologiske egenskaber ved NKS-21 sig tydeligt fra egenskaberne ved NCIB 10.436 og NCIB 10.438 på følgende punkter:

30 1) *Bacillus alcalophilus* NCIB 10.436 og NCIB 10.438 voksede ikke i et mannitolmedium, hvorimod NKS-21 voksede deri, og

- 2) NCIB 10.436 voksede ikke i en kødekstrakt/peptonvæske indeholdende 7% natriumchlorid, hvorimod NCIB 10.438 og NKS-21 voksede deri.

5 På grund af de ovennævnte forskelle adskiller NKS-21 sig fra *Bacillus alcalophilus* NCIB 10.436 og NCIB 10.438, selv om visse mikrobiologiske egenskaber ved NKS-21 ligner egenskaberne ved *Bacillus alcalophilus*.

10 Endvidere ligner NKS-21 *Bacillus subtilis* ved, at størrelsen af de vegetative celler af *Bacillus subtilis* er 0,7-0,8 μ m i bredden, og 2-3 μ m i længden, og at *Bacillus subtilis* nedbryder stivelse. Imidlertid adskiller NKS-21 sig fra *Bacillus subtilis* på følgende punkter:

- 1) *Bacillus subtilis* vokser godt ved en pH-værdi på 5,5-8,5, men vokser ikke ved en pH-værdi på 9-10, ved hvilken NKS-21 vokser godt, og
- 15 2) den maksimale væksttemperatur for *Bacillus subtilis* er 45-55°C, hvorimod NKS-21 ikke vokser ved en temperatur over 43°C.

Derfor adskiller NKS-21 sig tydeligt fra *Bacillus subtilis*.

20 NKS-21 adskiller sig således tydeligt, hvad angår mikrobiologiske egenskaber, fra de kendte *Bacillus pasteurii*, *Bacillus alcalophilus* og *Bacillus subtilis*, og der er ikke beskrevet nogen art med de samme mikrobiologiske egenskaber som NKS-21 i *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. NKS-21 identificeres derfor som en hidtil ukendt art tilhørende slægten *Bacillus*.

25 Som mikroorganisme ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan der ud over NKS-21 anvendes sådanne naturlige eller kunstige mutanter af NKS-21, som stadig har i det væsentlige samme egenskaber som denne og derfor kan henregnes til arten *Bacillus* sp. nov. NKS-21.

Den hidtil ukendte alkaliske protease API-21, som fås ved dyrkning af NKS-21 ifølge opfindelsen, beskrives detaljeret i det følgende.

5 NKS-21 kan dyrkes aerobt, fx i peptondyrkningsmedium med en pH-værdi på 8-10 ved rystedyrkning eller aerob agiteringsdyrkning efter inokulering af NKS-21 i dyrkningsmediet ved en temperatur på 10-40°C i 40-150 timer. Efter at dyrkningen er fuldført, adskilles de dyrkede mikrobielle celler let fra det dyrkede produkt, hvorved den klare dyrkningssupernatantopløsning kan udvindes. Den alkaliske protease API-21 udfældes let ved tilsætning af et organisk opløsningsmiddel såsom ethanol til supernatantopløsningen. Den udfældede 10 alkaliske protease API-21 underkastes separation i centrifuge og frysetørres i vakuum. Herved fås det ønskede enzym, alkalisk protease API-21.

15 Aktiviteten af den således vundne alkaliske protease API-21 bestemmes som følger:

Den dyrkede klare opløsning eller enzymopløsningen fortyndes hensigtsmæssigt med 0,1 M natriumcarbonat/0,1 M borsyre/kaliumchlorid-pufferopløsning (pH-værdi 10,0). Til 0,5 ml af den resulterende opløsning sættes 0,5 ml 2% s mælkecaseinopløsning med en pH-værdi på 20 10,0, og derefter udføres en enzymreaktion ved 30°C i 10 minutter. Efter at reaktionen er løbet til ende, sættes 2 ml 0,1 M trichloreddikesyre indeholdende 0,2 M eddikesyre/0,2 M natriumacetat til reaktionsblandingen for at standse reaktionen. Blandingen lades henstå i 10 minutter eller mere ved 30°C og filtreres derefter gennem filterpapir. 25 5 ml 0,4 M natriumcarbonat og 1 ml 5 gange fortyndet "phenolreagens" sættes til 1 ml af det ovenfor vundne filtrat, og blandingen lades henstå ved 30°C i 20 minutter for at udvikle farve. Derefter måles den farvede blandings absorbans ved 660 nm. Enzymenheden bestemmes i henhold til "Commission on Biochemical Nomenclature" 30 (*Comprehensive Biochemistry*, bind 13, 1973, s. 26-27), idet den mængde alkalisk protease, som frigiver trichloreddikesyreopløselige stoffer, der udviser farveudvikling ved 660 nm, svarende til 1 mol tyrosin fra 1% caseinsubstrat med en pH-værdi på 10,0 ved 30°C på 1 sekund, defineres som "1 katal".

De fysisk-kemiske egenskaber ved den alkaliske protease API-21 (der i det følgende betegnes som nærværende enzym) beskrives detaljeret nedenfor.

1) Aktivitet

- 5 Hydrolyserer proteiner såsom casein, hæmoglobin, albumin, globulin, kødprotein, fiskeprotein og soyaprotein.

2) Indvirkning af pH på enzymaktivitet

Som vist i fig. 1 er den optimale pH fra ca. 10 - ca. 11. Den relative aktivitet blev bestemt som følger.

- 10 Hver pufferopløsning (0,5 ml), som er anført nedenfor og indeholder 2% mælkecasein, sættes til 50 µl af nærværende enzymopløsning til fremstilling af en testopløsning.

	pH-værdi	Pufferopløsning
15	6-9	0,1 M kaliumphosphat/0,05 M natriumborat
	9-11	0,1 M natriumcarbonat/0,1 M borsyre/kaliumchlorid
	11-12	0,1 M dinatriumhydrogenphosphat/natriumhydroxid
20		

Testopløsningens enzymaktivitet blev bestemt på den ovenfor beskrevne måde. Den relative aktivitet (%) blev beregnet, idet enzymaktiviteten ved en pH-værdi på 10,0 blev defineret som 100%.

3) Indvirkning af pH på stabilitet uden substrat

Som vist i fig. 2 er nærværende enzym stabilt i et pH-område på fra ca. 7 til ca. 11,5.

Nærværende enzyms stabilitet blev bedømt som følger.

- 5 Hver af de nedenfor anførte pufferopløsninger (0,5 ml) sættes til 50 µl af nærværende enzymopløsning, som var dialyseret og tilpas fortyndet, og blandingen blev inkuberet ved 30°C i 10 minutter.

	pH-værdi	Pufferopløsning
10	3-8	0,1 M citronsyre/0,2 M dinatriumhydrogenphosphat
	8-11	0,1 M natriumcarbonat/0,1 M borsyre/kaliumchlorid
15	11-12	0,15 M dinatriumhydrogenphosphat/natriumhydroxid

- 20 Efter inkubation sættes 9,5 ml af en 0,1 M carbonatpufferopløsning indeholdende 2% casein og med en pH-værdi på 10,0 til blandingen. Blandingens enzymaktivitet blev bestemt på den ovenfor beskrevne måde. Den relative aktivitet (%) blev beregnet, idet enzymaktiviteten ved en pH-værdi på 10,0 blev defineret som 100%.

- 25 Som vist i fig. 2 var nærværende enzym mest stabilt ved en pH-værdi på fra ca. 10 til ca. 11. I dette pH-område blev nærværende enzyms oprindelige aktivitet fuldstændig bibeholdt. Endvidere blev 80% eller mere af restaktiviteten udvist ved en pH-værdi på 7-11,5.

4) Indvirkning af temperatur på enzymaktivitet

Som vist i fig. 3 var nærværende enzym aktivt over for casein ved en temperatur på 5-65°C og ved en pH-værdi på 10,0. Den optimale temperatur var 45-50°C.

5 5) Indvirkning af temperatur på stabilitet uden substrat

10 Som vist i fig. 4A og 4B bevares nærværende enzyms aktivitet fuldstændigt op til 40°C efter opvarmning uden substrat ved en pH-værdi på 10,0 i 10 minutter, men det meste af aktiviteten gik tabt ved 50°C. Endvidere bevares nærværende enzyms aktivitet op til 45°C ved en pH-værdi på 8 i 10 minutter, men deaktivering fandt sted ved 50°C, og enzymet var i det væsentlige deaktiveret ved 60°C.

6) Stabilitet ved lagring

15 Nærværende enzym er stabilt over for frysning og frysetørring. Der iagttoges ingen væsentlig nedgang i aktiviteten af den frysetørrede prøve, når prøven lodes henstå ved stuetemperatur i 2 uger. Nærværende enzyms aktivitet blev fuldstændigt bibeholdt, når den frysetørrede prøve blev lagret i en desiccator ved stuetemperatur.

20 7) Inhibering

25 Nærværende enzym blev inhiberet i bemærkelsesværdig grad af en aktiv serinrestinhibitor såsom diisopropylfluorophosphorsyre (DFP) og phenylmethansulfonylfluorid (PMSF). Det blev også inhiberet af benzyloxycarbonyl-phenylalanin-chlormethylketon (ZPCK). Nærværende enzym blev imidlertid ikke inhiberet af tosyl-phenylalanin-chlormethylketon (TPCK), som er en inhibitor for en animalsk serinprotease, chymotrypsin, og tosyl-lysin-chlormethylketon (TLCK), som er en trypsininhibitor.

5 Endvidere blev nærværende enzyms aktivitet ikke ugunstigt påvirket af tilsætning af p-chlor-kviksølvbenzoat (PCMB) og ethylendiamintetraacetat (EDTA). Desuden blev nærværende enzyms aktivitet ikke ugunstigt påvirket af tilsætning af pepstatin. Det fremgår af ovenstående inhiberingstest, at nærværende enzym er en protease med en serinrest i det aktive sted.

8) Bestemmelsesmetode for enzymaktivitet

Som beskrevet ovenfor.

10 9) Molekylvægt

Nærværende enzyms molekylvægt er ca. 22.000, bestemt ved gelfiltrering over Sephadex® G-75 ved en pH-værdi på 10.

10) Isoelektrisk punkt

15 Nærværende enzyms isoelektriske punkt er 7,4 bestemt ved en elektrofokuseringsmetode.

11) Ultraviolet (UV) absorption

Absorptionsspidsen er til stede ved 275-282 nm i et UV absorptionsspektrum.

12) Infrarød (IR) absorptionsspektrum

20 Som vist i fig. 5.

13) Grundstofanalyse

25 Udeladt, fordi de karakteristiske forskelle i disse typer højmolekylære stoffer såsom nærværende enzym ikke så godt kan udtrykkes ved sammenligning af indholdet af grundstoffer deri, såsom carbon, nitrogen eller hydrogen.

14) Aminosyresammensætning

Aminosyresammensætningen af API-21 blev tentativt bestemt på grundlag af resultaterne af syrehydrolyse af enzymet undtagen for cystein/cystin og tryptophan, på grundlag af resultaterne af permyresyredekomponering for cystein/cystin-analyse og på grundlag af resultaterne af basisk dekomponering for tryptophananalyse i henhold til den i litteraturen beskrevne metode (*Methods in Enzymology*, bind XI, 1967, Academic Press, New York) og er vist i tabel 1 sammen med sammensætningen af andre alkaliske proteaser, hvis data er angivet i litteraturstederne *1 og *2.

Som vist i tabel 1 er der store forskelle mellem API-21 og de andre angivne enzymer med hensyn til aminosyresammensætning såsom serin, arginin, lysin, valin, alanin, tryptophan, prolin, etc.

Tabel 1

Sammenligning af aminosyresammensætning
mellem API-21 og andre alkaliske proteaser

	Aminosyre	API-21	subtilisin	subtilisin
			Novo *1	Carlsberg *2
20	Lysin	4	11	9
	Histidin	8	6	5
	Arginin	8	2	4
25	Tryptophan	0	3	1
	Asparaginsyre/Asparagin	27	11	9
	Threonin	10	17	19
			13	19
	Serin	17	37	32
			4	5
	Glutaminsyre/Glutamin	14	11	7
30	Prolin	7	14	9
	Glycin	30	33	35
	Alanin	26	37	41

Tabel 1 fortsat

	Valin	20	30	31
	Methionin	4	5	5
	Isoleucin	10	13	10
5	Leucin	14	15	16
	Tyrosin	12	10	13
	Phenylalanin	4	3	4
	Cystein/Cystin	0	0	0

10 *1 *J. Biol. Chem.* 243, 1968, s. 5296

 *2 *J. Biol. Chem.* 243, 1968, s. 2134

Det fremgår af ovennævnte resultater, at nærværende enzym, som har en optimal pH-værdi på 10-11, bevarer sin aktivitet ved en relativt lav temperatur, men deaktiveres ved en relativt høj temperatur (dvs. 15 50°C eller mere). Nærværende enzym med disse fysisk-kemiske egenskaber sammenlignes i det følgende med kendte tilsvarende alkaliske proteaser.

Nogle ekstracellulære alkaliske proteaser, som stammer fra grampositive bakterier, er velkendte, fx alkalisk protease (subtilisin Carlsberg), som stammer fra *Bacillus licheniformis*, og alkalisk protease 20 (subtilisin Novo), som stammer fra *Bacillus subtilis*.

Disse enzymer er proteaser med en serinrest i det aktive sted, en molekylvægt på ca. 27.000-30.000 og et isoelektrisk punkt på 9-11. De fleste af de andre beskrevne ekstracellulære alkaliske proteaser, som 25 stammer fra *Bacillus*, har en molekylvægt på 25.000-30.000 og et isoelektrisk punkt på 9-11. De fleste af de ovennævnte enzymer deaktiveres ikke ved opvarmning ved 50°C og pH 10 i 10 minutter. Kendte alkaliske proteaser med en lavere molekylvægt, der stammer fra slægten *Bacillus*, er alkalisk protease E-1 og E-2 fra *Bacillus* nr. 30 D-6, som begge har en molekylvægt på 20.000, og hvis aktivitet overhovedet ikke nedsættes ved opvarmning til 50°C og pH 9,0, (jfr.

- japansk fremlæggeskrift nr. 56-4236). Kendte inden for dette fagområde som en alkalisk protease fra slægten *Bacillus* er endvidere en alkalisk protease, som stammer fra *Bacillus alcalophilus* NCIB 10.436, og en alkalisk protease, som stammer fra *Bacillus alcalophilus* NCIB 10.438. Disse enzymer bevarer imidlertid ca. 90% af deres aktivitet ved opvarmning til 50°C og pH 10 i 10 minutter som vist i tabel 2. Det fremgår også af tabel 2, at alkaliske proteaser, der stammer fra *Bacillus licheniformis* og *Bacillus subtilis*, bevarer 70-80% af deres aktivitet ved opvarmning til 50°C og pH 10 i 10 minutter.
- 5
- 10 Kendte alkaliske proteaser, som stammer fra bakterier tilhørende slægten *Bacillus* såsom *Bacillus subtilis*, er således stabile i et relativt højt temperaturområde. I modsætning hertil mister nærværende enzym som nævnt ovenfor det meste af sin aktivitet ved 50°C og pH 10 i 10 minutter, hvorimod det er stabilt ved opvarmning til en temperatur på
- 15 op til 40°C og pH 10 i 10 minutter. Endvidere finder deaktivering af nærværende enzym sted ved opvarmning til ca. 50°C og pH 8 i 10 minutter, og det meste af dets aktivitet går tabt ved 60°C under de samme betingelser. I betragtning af forskellene i egenskaberne med hensyn til temperaturstabilitet, molekylvægt og isoelektrisk punkt
- 20 adskiller nærværende enzym sig tydeligt fra de kendte alkaliske proteaser, som stammer fra bakterier tilhørende slægten *Bacillus*, og er ikke tidligere beskrevet. Som følge heraf bestemmes nærværende enzym som et hidtil ukendt enzym og betegnes "alkalisk protease API-21".

Tabel 2

5	Alkalisk protease	Molekyl- vægt	Isoelek- trisk punkt	Restaktivitet (%)	
				ved opvarmning ved pH 10 i 10 minutter 50°C	60°C
	Alkalisk protease fra <i>Bacillus licheniformis</i>	27.287 ^{*3)}	9,4 ^{*3)}	78	2
10	Alkalisk protease fra <i>Bacillus subtilis</i>	27.537 ^{*4)}	9,1 ^{*4)}	70	1
	Alkalisk protease fra <i>Bacillus alcalophilus</i> NCIB 10.436	-	-	94	73
15	Alkalisk protease fra <i>Bacillus alcalophilus</i> NCIB 10.438	25.000	-	85	63
	Alkalisk protease fra <i>Bacillus</i> NKS-21	22.000	7,4	6	1
20	^{*3} <i>Fette Seiten Anstrichmittel</i> . 75, 1973, s. 49. ^{*4} <i>The Enzymes</i> bind III, 1971, s. 564.				

Nærværende enzym "API-21" kan anvendes med en detergentforstærker og er således nyttigt som tilsætningsstof til detergenter, eftersom det er stabilt ved en pH-værdi på 7-11,5, og den maksimale enzymaktivitet opnås ved en pH-værdi på 10-11 som nævnt ovenfor. Nærværende enzym bevarer navnlig sin høje aktivitet selv ved en relativt lav temperatur (fx 20-30°C) sammenlignet med sædvanlige enzymer til detergenter. Nærværende enzym er derfor en særdeles ønskelig type alkalisk protease som tilsætningsstof til et husholdningsdetergent i et land såsom Japan, hvor tøj vaskes ved stuetemperatur. Endvidere kan nærværende enzym også udnyttes effektivt til affaldsbehandling og spildevandsbehandling til hurtig nedbrydning af protein og genbrug af nitrogenressourcer, da indholdet af protein i husholdningsaffald og husholdningsspildevand for nylig er blevet forøget. Desuden er anvendelsen af nærværende protease i levnedsmiddelindustrien såsom til levnedsmiddelforarbejdning fordelagtig, da enzymet let kan deaktiveres

efter anvendelse ved opvarmning til en relativt lav temperatur, fx 50-60°C. Således er anvendelsen af nærværende enzym effektiv, hvad angår kvalitetskontrol af det forarbejdede levnedsmiddel.

I de tilfælde, hvor nærværende enzym "API-21" inkorporeres i en
5 detergentkomposition, anvendes enzymet "API-21" sædvanligvis i en
mængde på 5-500 nkatal (eller 10^{-9} katal), især 10-100 nkatal, pr.
1 g af detergentkompositionen, selv om der ikke er nogen begræns-
ninger i mængden af inkorporeret enzym.

Ud over enzymet "API-21" kan den enzymholdige detergentkomposition
10 indeholde en hvilken som helst sædvanlig detergentbestanddel, uden
at de inkorporerede mængder deraf i sædvanlige detergentkompositioner
ændres. Typiske eksempler på sådanne detergentbestanddele er 10-50
vægtprocent af et overfladeaktivt middel, 0-50 vægtprocent af en
forstærker, 1-50 vægtprocent af et basisk middel eller en uorganisk
15 elektrolyt og 0,1-5 vægtprocent af et anti-genaflejringsmiddel, et
enzym, et blegemiddel, et optisk (eller fluorescerende) farvestof, et
middel, som forhindrer sammenbagning, og en antioxidant. Inkorpore-
ringen af enzymet "API-21" kan udføres på en hvilken som helst
sædvanlig måde. Det foretrækkes imidlertid, at enzymet inkorporeres i
20 detergentkompositionen i form af en opløsning eller i sådan form, at
støvdannelse forhindres af miljøbeskyttelseshensyn.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler.

EKSEMPEL 1

Den her omhandlede hidtil ukendte stamme NKS-21 blev dyrket i et
25 skråkulturmedium. Det dyrkede produkt blev suspenderet i sterilise-
ret vand, og 0,5 ml af denne suspension blev anvendt som podestof.

Et enzymfrembringende dyrkningsmedium, som indeholdt 1% casein, 1% kødekstrakt, 1% polypepton og 1% natriumhydrogencarbonat, blev indstillet til en pH-værdi på 9,5 eller 7,2 ved tilsætning af vandig natriumhydroxid eller saltsyre.

- 5 Ved rystedyrkning (A) under anvendelse af en rotationsryster sættes 100, 200 eller 300 ml af det ovennævnte medium med en pH-værdi på 9,5 til en 1 l Erlenmeyer-kolbe. Efter sterilisering blev dyrkningsmediet podet med 0,5 ml af den ovenfor fremstillede NKS-21-suspension, og dyrkningen udførtes ved 20°C og under rystebetingelser på 200 rpm i 41, 65 eller 89 timer.

- 15 På den anden side sættes ved reciprok rystedyrkning (B) 100 ml af det ovenfor fremstillede dyrkningsmedium med en pH-værdi på 9,5 eller 7,2 til en 500 ml Sakaguchi-kolbe. Efter sterilisering podedes dyrkningsmediet med 0,5 ml af den ovenfor fremstillede NKS-21-suspension, og den reciprokke rystedyrkning udførtes under rystebetingelser på 110 cpm ved 30°C i 66 eller 90 timer.

- 20 Efter dyrkning blev det dyrkede produkt centrifugeret ved $28.000 \times g$ i 15 minutter, og den resulterende supernatantopløsning blev udvundet. Denne opløsnings alkaliske proteaseaktivitet blev bestemt på den ovenfor beskrevne måde.

Resultaterne er vist i tabel 3 og 4.

Tabel 3

Resultater af rotationsrystedyrkning (A)
(20°C, mediets oprindelige pH = 9,5)

25	Mængde af medium (ml)	Enzymaktivitet μ katal/l		
		41 timer	65 timer	89 timer
	100	1,3	2,6	2,7
30	200	2,0	4,3	4,0
	300	2,5	5,6	5,4

Tabel 4

Resultater af reciprok rystedyrkning (B) (30°C)

5	Mediets oprindelige pH	Enzymaktivitet μ katal/l	
		66 timer	90 timer
	9,6	4,5	3,0
	7,2	4,9	3,4

- 10 Når NKS-21 blev udsat for reciprok rystedyrkning ved 30°C, var væksten af NKS-21 ikke alene god ved en oprindelig pH af mediet på 9,5, men også ved en oprindelig pH af mediet på 7,2, og den ønskede alkaliske protease af API-21 blev dannet i stor mængde i hvert tilfælde. Som i tilfældet med en oprindelig pH af mediet på 9,5 blev tilsvarende resultater opnået, når NKS-21 blev dyrket i en reciprok ryster ved 20°C og en oprindelig pH af mediet på 7,2.

- 20 7 liter af supernatantopløsningen efter centrifugeseparationen af det af NKS-21 frembragte ovenfor vundne dyrkede produkt blev afkølet til 3°C. Derefter sættes 2 volumendele ethanol, som forinden var afkølet til 3°C, til den afkølede supernatantopløsning til dannelse af bundfald. Det resulterende bundfald blev udskilt ved centrifugering i en afkølet centrifugeseparator ved 11.000 $\times$ g, hvorefter det udskilte bundfald omgående blev frysetørret i vakuum. Herved vandtes 15,7 g af det ønskede enzympulver.

- 25 Den specifikke aktivitet af den således vundne alkaliske protease baseret på 1 kg af proteinet var 0,71 μ katal (0,71 μ katal/kg $\times$ protein), og udbyttet var 33%, når proteinet blev bestemt i henhold til Lowry-metoden.

- 30 Den således vundne frysetørrede enzymprøve blev opløst i 0,01 M natriumcarbonat/borsyre/kaliumchloridpufferopløsning (pH-værdi 10,0) indeholdende 0,2 M natriumchlorid. Enzymopløsningen blev gelfiltreret over en søjle (2 cm i diameter, længde 74 cm) pakket med Sephadex®

G-75 (forhandles af Pharmacia Fine Chemicals AB, Sverige), som forinden var ækvilibreret med den ovennævnte pufferopløsning, hvorved vandtes eluatfraktioner på hver 3 ml. Det rensede enzym vandtes fra hovedfraktioner med en høj enzymaktivitet. Det således vundne
5 enzym havde en molekylvægt på ca. 22.000 bestemt ved gelfiltrering over Sephadex® G-75 ved en pH-værdi på 10 og et isoelektrisk punkt på 7,4 bestemt ved en elektrofokuseringsmetode. Den specifikke aktivitet af det således vundne enzym blev forøget ca. 10 gange sammenlignet med den specifikke aktivitet uden gelfiltrering, og den
10 specifikke aktivitet baseret på 1 kg protein var 7,0 μ katal. Udbyttet var 70%.

EKSEMPEL 2

Fremstillingen af alkalisk protease i en 500 liters fermenteringstank og den efterfølgende fremstilling af enzympræparatet blev udført under
15 anvendelse af stammen NKS-21, der danner alkalisk protease.

. Et enzymfrembringende dyrkningsmedium indeholdende 1% casein, 1% kødekstrakt, 1% polypepton og 1% natriumhydrogencarbonat blev indstillet til en pH-værdi på 9,5 ved tilsætning af vandig natriumhydroxid. 300 ml af det ovennævnte medium sættes til en 1 liters Erlenmeyer-kolbe. Efter sterilisering blev dyrkningsmediet podet med 0,5
20 ml af NKS-21-suspensionen, der var fremstillet som beskrevet i eksempel 1, og dyrkningen blev udført ved 20°C i 3 dage. 300 ml af det resulterende dyrkede produkt sættes til en steriliseret 30 liters krukke-fermentor indeholdende 10 liter af det ovennævnte dyrkningsmedium med en pH-værdi på 9,5. Derefter udførtes aerob agiteringsdyrkning ved 20°C i 3 dage med en agiteringshastighed på 400 rpm og en luftningshastighed på 12 liter/min.

Efter dyrkning i 30 liters krukke-fermentor i 3 dage overflyttes 10 liter af det dyrkede produkt til en steriliseret 500 liters fermenteringstank indeholdende 220 liter af det ovenfor fremstillede dyrkningsmedium med en pH-værdi på 9,5. Derefter udførtes aerob agiteringsdyrkning ved 20°C i 4 dage med en agiteringshastighed på 400 rpm og en luftningshastighed på 200 liter/min.

Efter dyrkning blev det dyrkede produkt centrifugeret ved $11.000 \times g$ i en afkølet kontinuert centrifugeseparator, og der vandtes 200 l supernatantopløsning. Denne supernatantopløsning blev afkølet til 3°C . Derefter sættes 2 volumendele ethanol, som forinden var afkølet til 3°C , til den afkølede supernatantopløsning for at udfælde den ønskede alkaliske protease. Den udfældede alkaliske protease API-21 blev udskilt i centrifuge ved ca. $11.000 \times g$ i en afkølet kontinuert centrifugeseparator, hvorefter den udskilte alkaliske protease API-21 med det samme blev frysetørret i vakuum. Herved vandtes følgende frysetørrede alkaliske protease API-21 enzympræparat.

Udvundet enzymvægt	1230 g
Specifik aktivitet ($\mu\text{katal/kg protein}$)	0,52
Udbytte	70%

Det således vundne enzym blev rensat på samme måde som beskrevet i eksempel 1, hvorved vandtes alkalisk protease med en molekylvægt på ca. 22.000 og et isoelektrisk punkt på 7,4.

EKSEMPEL 3

Den ovenfor vundne alkaliske protease "API-21" og en kommercielt tilgængelig alkalisk protease til et detergent, som blev anvendt som sammenligningseksempel, blev bedømt ved at inkorporere enzymerne i forskellige detergentkompositioner. Vasketesten for af blod tilsmudsede tekstiler blev udført som følger:

A. Fremstilling af bomuldstekstiler tilsmudset med helblod

Tekstilprøver blev dyppet i friskt bovint helblod umiddelbart efter indsamling af dette, hvilket helblod indeholdt 1 volumen af en natriumcitratopløsning pr. 9 volumen tilsat blod for at forhindre koagulering. 70% af væsken blev presset ud af de tilsmudsede tekstilprøver ved hjælp af en rulle for at opnå ensartet tilsmudsede tekstiler. Derefter blev tekstilprøverne lufttørret i et rum uden adgang til direkte sollys og derefter opbevaret ved en temperatur på $0-5^{\circ}\text{C}$ på

et køligt, mørkt sted. Efter fremstilling blev tekstilprøverne klippet i stykker med en størrelse på 10 x 15 cm.

	Tekstilprøver:	10 cm x 15 cm
	Tilsmudsningsvæske:	100 ml pr. 10 tekstilprøver
5	Tilsmudsningstemperatur:	10°C ± 2°C.
	Tilsmudsningstid:	5 minutter (agiteringsretningen blev ændret hvert 30. sekund).

B. Vaskeprocedure

10 Tekstilprøverne blev vasket og skyllet (3 gange) under nedenstående betingelser i et Terg-O-Tometer.

Vaskebetingelser

	Tilsmudsede tekstiler:	5 x 10 cm
	Detergent:	0,133% (0,7 nkatal/ml enzym)
	Detergent/vandforhold:	1:85
15	Agitering:	105 rpm
	Vasketid:	10 minutter.

Skyllebetingelser

	Tilsmudsede tekstiler:	5 x 10 cm
	Skyllemiddel/vand forhold:	1:85
20	Agitering:	105 rpm
	Skylletid:	3 min.

Efter skylning blev tekstilprøverne lufttørret i et rum uden adgang til direkte sollys.

C. Det anvendte detergent og enzym

25 Nedenstående 6 fosfat- og ikke-fosfatdetergenter blev anvendt som vaskemiddel.

Detergentsammensætning

Sammensætning		Phosphat-detergent	Ikke-phosphat detergent
5	Overfladeaktivt middel	15%	15%
	Natriumtripolyphosphat	17	-
	Zeolit	-	17
	Natriumsilicat	5	5
	Natriumcarbonat	3	3
10	Carboxymethylcellulose	1	1
	Vand	8	8
	Natriumsulfat	balance	balance

- 15 pH-Værdien af hver detergent målt i en 0,133% koncentration ved 25°C var som følger:

Detergentets pH-værdi

Type overfladeaktivt middel		Phosphat-detergent	Ikke-phosphat detergent
20	LAS-type detergent ¹	10,18	10,18
	SDS-type detergent ²	9,76	9,86
	AOS-type detergent ³	9,95	10,17

¹ LAS: Natriumlinear alkylbenzensulfonat

25 ² SDS: Natriumdodecylsulfat

³ AOS: Alpha-olefinsulfonat

Det anvendte enzym var en kommercielt tilgængelig alkalisk protease til et detergentpræparat eller den ovenfor vundne alkaliske protease "API-21". Resultaterne er vist i tabel 5.

Detergentets effektivitet mod proteintilsmudsning blev bestemt som følger:

- 5 Testvæskeprøver vandtes ved varmeeekstraktion af tilsmudsede tekstiler før og efter vask med 100 ml af en 0,1 N vandig NaOH-opløsning ved en temperatur på $90 \pm 2^\circ\text{C}$ i 120 minutter. Testvæskeprøven blev kemisk farvet med et kobber-folinreagens, og dens absorbans blev målt ved en bølgelængde på 750 nm. Detergentets effektivitet (D) blev beregnet ud fra nedenstående ligning:

$$10 \quad D \quad (\%) = \frac{D_s - D_w}{D_s - D_c} \times 100$$

hvor D_c = Absorbans af ekstrakt fra standardbomuldstekstiler (1 g)

D_s = Absorbans af ekstrakt fra tilsmudsede tekstiler (1 g) før vask

- 15 D_w = Absorbans af ekstrakt fra tilsmudsede tekstiler (1 g) efter vask

Tabel 5

5	Deter- gent	Tilstede- værelse af phos- phat	Vaske- tempe- ratur	Detergentets effektivitet (%)			
				Vand	Deter- gent alene	Tilsat API-21	Tilsat kom- merciel alka- lisk protease til detergen- ter
10	LAS type	Ja	10°C	35,0	68,6	85,7	78,6
		Nej			68,8	82,0	77,3
	SDS type	Ja			68,0	85,6	77,7
		Nej			70,2	85,8	80,9
15	AOS type	Ja	25°C	40,9	69,4	87,0	80,4
		Nej			68,0	86,9	80,0
	LAS type	Ja			73,9	89,8	88,6
		Nej			72,0	90,0	88,5
20	SDS type	Ja			74,0	91,0	89,1
		Nej			69,4	91,3	87,7
	AOS type	Ja			75,9	91,6	91,6
		Nej			74,5	90,0	91,6
25	LAS type	Ja	40°C	45,9	73,8	91,7	90,0
		Nej			74,8	94,3	92,1
	SDS type	Ja			73,2	92,4	90,0
		Nej			74,2	91,7	89,7
30	AOS type	Ja			80,3	92,6	90,5
		Nej			79,0	91,2	91,0

EKSEMPEL 4

Den i eksempel 3 beskrevne vasketestprocedure blev gentaget med undtagelse af, at proteaseaktiviteten i vaskeopløsningen og vasketem-
 35 peraturen blev ændret, hvad angår det ikke-phosphatholdige deter-
 gent af LAS-typen indeholdende den alkaliske protease "API-21".

Resultaterne er vist i tabel 6.

Tabel 6

Detergentets effektivitet

5	Proteaseaktivitet i vaskeopløsningen (nkatal/ml)	Vasketemperaturer		
		10°C	25°C	40°C
10	0	68,8	72,0	74,8
	0,7	78,2	87,8	89,4
	2,1	80,5	88,6	92,8
	3,5	80,8	89,4	92,8
	7	82,0	89,8	94,3

15 EKSEMPEL 5

Vasketests for snavsede kraver blev udført under anvendelse af forskellige detergenter, som indeholdt den ovenfor vundne alkaliske protease "API-21" eller en kommercielt tilgængelig, alkalisk protease til en detergentkomposition, på følgende måde.

20 A. Fremstilling af snavsede kraver

200 stk. snavsede kraver fremstillet af standardbomuldstekstiler til vaskemiddeltestning med en størrelse på 7 x 37 cm blev klippet i små stykker med en størrelse på 1 x 5 cm. De anvendte kraver blev brugt en uge i henhold til den af Motoi Minagawa og Ikuko Okamoto, *Seni Seihin Shohi Kagaku* 19, 1978, s. 106-115, beskrevne metode. 10 vilkårligt udvalgte små stykker blev syet sammen til dannelsen af testtekstiler med en størrelse på 5 x 10 cm, som blev opbevaret ved en temperatur på 0-5°C på et koldt, mørkt sted.

B. Vaskeprocedure

Tekstilprøverne blev vasket og skyllet (3 gange) under nedenstående betingelser i et Terg-O-Tometer.

Vaskebetingelser

- | | | |
|----|----------------------------|------------------------------|
| 5 | Tilsmudsede tekstiler: | 5 × 10 cm |
| | Detergent: | 0,133% (0,7 nkatal/ml enzym) |
| | Detergent/vandforhold: | 1:85 |
| | Agitering: | 105 rpm |
| | Vasketid: | 10 minutter. |
| 10 | Skyllebetingelser | |
| | Tilsmudsede tekstiler: | 5 × 10 cm |
| | Skyllemiddel/vand forhold: | 1:85 |
| | Agitering: | 105 rpm |
| | Skylletid: | 3 min. |
- 15 Efter skylning blev tekstilprøverne lufttørret i et rum uden adgang til direkte sollys.

C. Det anvendte detergent og enzym

Nedenstående 4 phosphatholdige og ikke-phosphatholdige detergenter blev anvendt som vaskemiddel.

Detergentsammensætning

Sammensætning		Phosphat-detergent	Ikke-phosphat detergent
5	Overfladeaktivt middel	15%	15%
	Natriumtripolyphosphat	17	-
	Zeolit (4A)	-	17
	Natriumsilicat	5	5
	Natriumcarbonat	3	3
10	Carboxymethylcellulose	1	1
	Vand	8	8
	Natriumsulfat	balance	balance

- pH-Værdien af hver detergent målt i en 0,133% koncentration ved 25°C
- 15 var som følger:

Detergentets pH-værdi

Type overfladeaktivt middel		Phosphat-detergent	Ikke-phosphat detergent
20	LAS-type detergent ¹	10,18	10,18
	AOS-type detergent ²	9,95	10,17

¹ LAS: Natriumlinear alkylbenzensulfonat

² AOS: Alpha-olefinsulfonat

- 25 Det anvendte enzym var en kommercielt tilgængelig alkalisk protease til et detergentpræparat eller den ovenfor vundne alkaliske protease "API-21". Resultaterne er vist i tabel 7.

Tabel 7

5	Deter- gent	Tilstede- værelse af phos- phat	Vaske- tempe- ratur	Detergentets effektivitet (%)			
				Vand	Deter- gent alene	Tilsat API-21	Tilsat kom- merciel alka- lisk protease til detergen- ter
10	LAS type	Ja	10°C	49,3	70,1	82,0	77,9
		Nej			66,7	82,1	73,6
15	AOS type	Ja	25°C	52,1	80,4	87,4	86,4
		Nej			75,0	86,8	83,3
20	LAS type	Ja	40°C	58,3	78,7	85,7	79,0
		Nej			78,0	80,1	74,2
25	AOS type	Ja	40°C	58,3	80,4	89,6	87,3
		Nej			80,2	91,2	88,1
30	LAS type	Ja	40°C	58,3	80,3	86,8	86,8
		Nej			81,0	91,2	89,7
30	AOS type	Ja	40°C	58,3	82,6	90,1	89,0
		Nej			86,1	89,1	90,4

PATENTKRAV

1. Alkalisk protease betegnet API-21,

k e n d e t e g n e t ved, at den har følgende fysisk-kemiske egenskaber:

- 5 a) at den har en optimal proteolytisk aktivitet ved en pH-værdi på 10-11 og ved en temperatur på 45-50°C, idet aktiviteten måles over for casein,
- b) at den er et protein med en molekylvægt på ca. 22.000 bedømt ved en gelfiltreringsmetode, et isoelektrisk punkt på 7,4, bedømt ved en
10 elektrofokuseringsmetode, en absorptionsspids på 275-282 nm i et UV-absorptionsspektrum, IR-absorptionskarakteristika som vist i fig. 5, og en serinrest i det aktive sted,

c) at den har følgende aminosyresammensætning:

	lysin	4
15	histidin	8
	arginin	8
	tryptophan	0
	asparaginsyre/asparagin	27
	threonin	10
20	serin	17
	glutaminsyre/glutamin	14
	prolin	7
	glycin	30
	alanin	26
25	valin	20
	methionin	4
	isoleucin	10
	leucin	14
	tyrosin	12
30	phenylalanin	4
	cystein/cystin	0

og

- d) at den er identisk med den protease, der dannes ved aerob dyrkning af *Bacillus*-stammen deponeret under nr. FERM BP-93 i et egnet basisk dyrkningsmedium.
- 5

2. Fremgangsmåde til fremstilling af den alkaliske protease ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en stamme af arten NKS-21, for hvilken stammen *Bacillus* FERM BP-93 er typestammen, dyrkes i et egnet basisk dyrkningsmedium, hvorpå den alkaliske protease API-21 udvindes fra det dyrkede produkt.

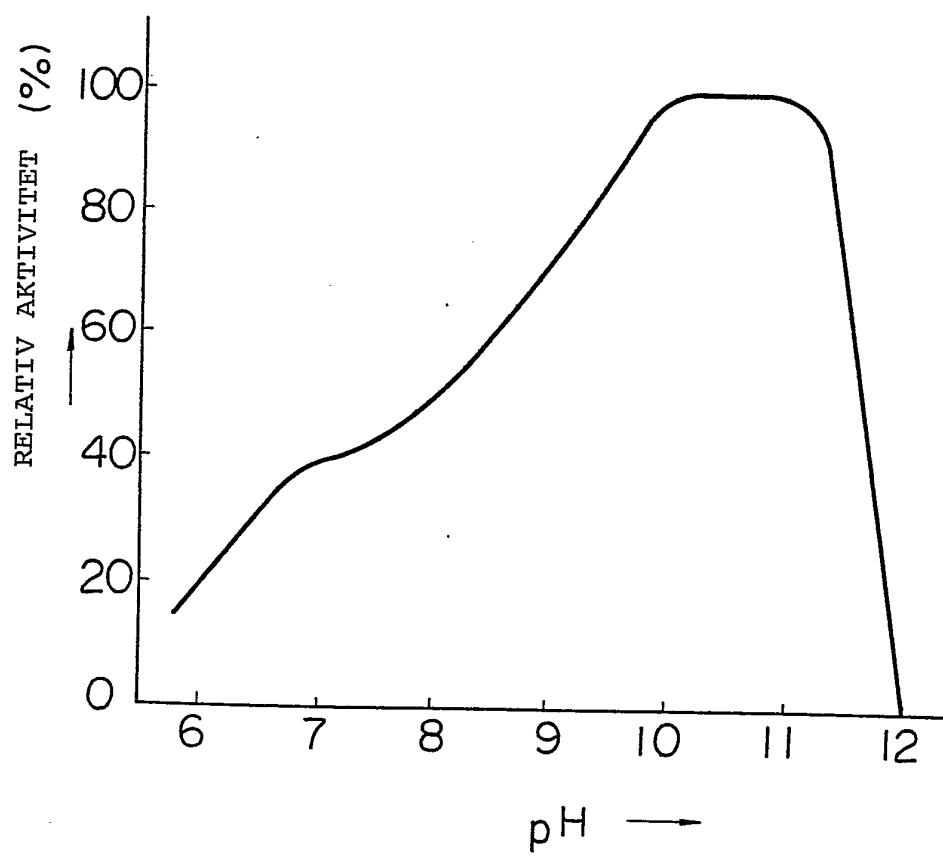
Fig. 1

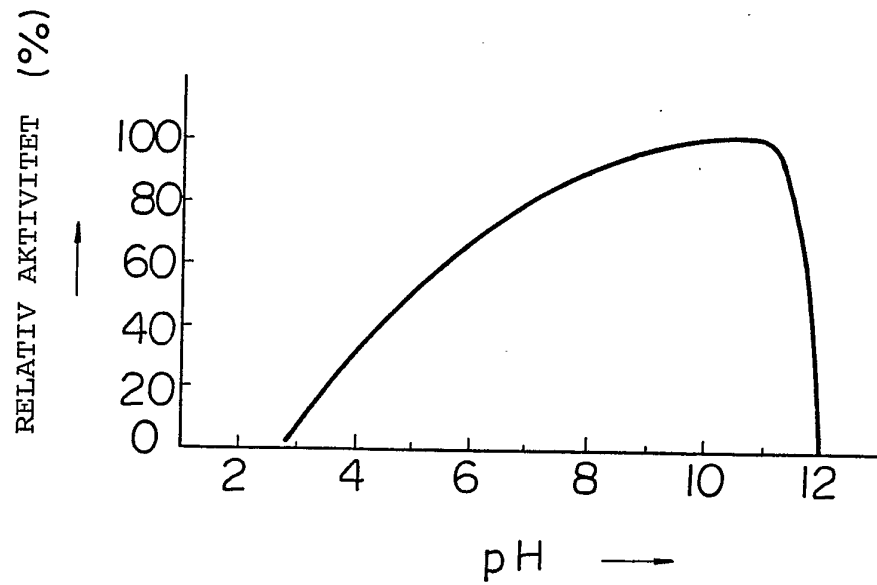
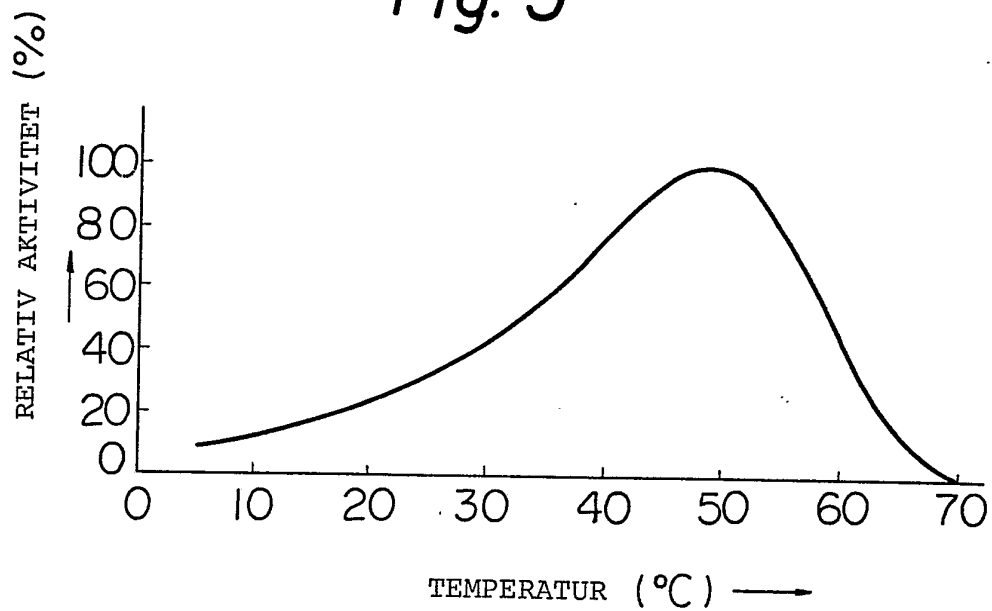
Fig. 2*Fig. 3*

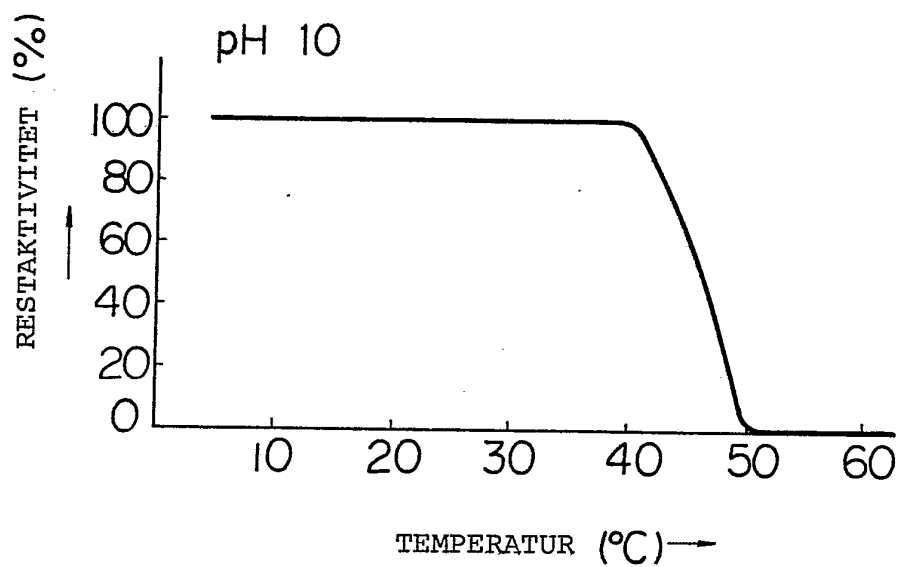
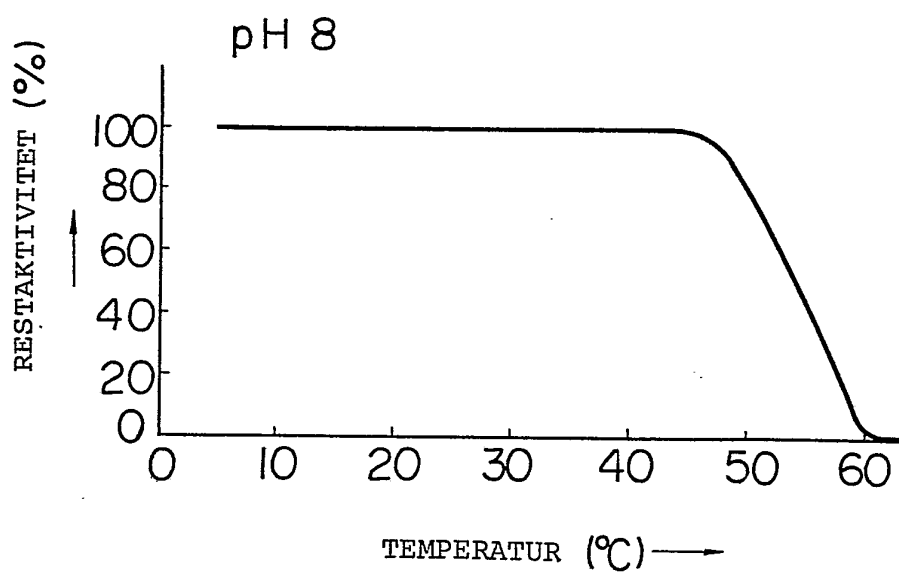
Fig. 4 A*Fig. 4 B*

Fig. 5