



F1000110436B



SUOMI – FINLAND (FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 110436 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

31.01.2003

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 9/54, C11D 3/386

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

934332

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

01.10.1993

(24) Alkupaivä - Löpdag

03.04.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

01.10.1993

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/DK92/00104

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

03.04.1991 DK 584/91 P

(73) Haltija - Innehavare

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

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Outtrup,Helle, Syvendehusvej 46, 2750 Ballerup, TANSKA, (DK)

2 •Dambmann,Claus, Hoeje Gladsaxe 61, 7. t.h., 2860 Soeborg, TANSKA, (DK)

3 •Lindegaard,Poul, Oester Soegade 52, 2100 Koebenhavn, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab
Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Uusia proteaaseja
Nya proteaser**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 40339 NCIMB

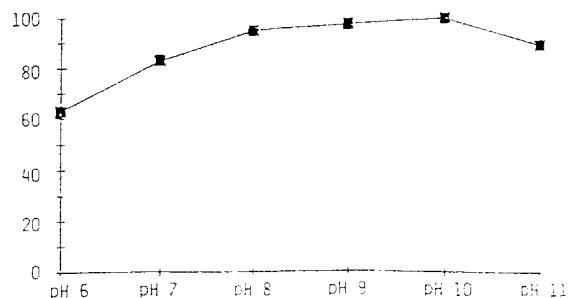
(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Biosis An:1991:48028 sammandrag

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee uuden *Bacillus* sp. kannoista peräisin olevia pesuaineproteaaseja. Tarkemmin keksintö koskee proteaasia, joka on peräisin *Bacillus* sp. TY 145 -kannasta. Keksintö koskee myös menetelmää proteaasin valmistamiseksi, proteaasin käyttöä puhdistusaine-entsyyminä ja pesuainekoostumuksia, jotka käsittävät keksinnön mukaisen proteaasin.

Uppfinningen avser rengöringsmedelproteaser som härstammar från en ny stam av *Bacillus* sp. Mer specifiskt uppfinningen avser proteas som härstammar från stammen av *Bacillus* sp. TY 145. Uppfinningen avser även ett förfarande för framställning av proteaset, användning av proteaset som rengöringsmedelenzym och rengöringsmedelkompositioner innehållande proteaset enligt uppfinningen.



Uusia proteaaseja - Nya proteaser

5 Keksintö koskee Bacillus lajin kannoista peräisin olevia
pesuaineproteaaseja. Tarkemmin keksintö koskee uutta emäk-
sistä proteaasia, joka on peräisin Bacillus sp. TY 145
-kannasta. Lisäksi keksintö koskee menetelmää proteaasin
valmistamiseksi, proteaasin käyttöä puhdistuaine-entsyyminä
ja puhdistuainekoostumuksia, jotka sisältävät keksinnön mu-
10 kaista proteaasia.

Puhdistuaine-entsyymejä on markkinoitu enemmän kuin 20
vuoden ajan ja ne ovat hyvin vakiintuneita tavallisina
pesuaine-ainesosina sekä jauhe- että nestepesuaineissa
15 kaikkialla maailmassa. Suuntauksen ollessa kohti alemmassa
lämpötilassa suoritettavia pesuja kohti, pesuaine-entsyymien
kukulus on kasvanut viimeisten vuosien aikana. Entsyymit,
joita on käytetty pesuformulatioissa, käsittävät proteaa-
sit, lipaasit, amylaasit, sellulaasit kuten myös muut ent-
20 syymit tai niiden seokset. Kaupallisesti tärkeimpiä ovat
proteaasit.

25 Pesuaineproteaasit on kehitetty eristämällä proteaaseja,
joita on löydetty luonnosta, mitä on seurannut niiden tes-
taaminen pesuaineformulaatioissa. Useimmat pesuaineproteaa-
sit saadaan Bacillus-suvun jäsenistä. Tällä hetkellä mark-
kinoille tulee uuden tyyppisiä proteaaseja, tarjoten sen
mahdollisuuden, että saadaan parempi kustannus/tehokkuus-
suhde erilaisissa spesifioiduissa olosuhteissa.

30

Esimerkkejä kaupallisista proteaasituotteista ovat ALCALA-
SE™, ESPERASE™ ja SAVINASE™, kaikki saatavissa firmasta
Novo Nordisk A/S, Tanska. Nämä ja samanlaiset entsyymituot-
teet muista kaupallisista lähteistä ovat aktiivisia pesu-
35 aineliuoksissa, so. pH-arvoissa alueella 8-11 ja sekvest-
rausaineiden, pinta-aktiivisten aineiden ja valkaisuainei-
den kuten natriumperboraatti läsnäollessa. ALCALASE™ -pro-
teaaasia tuottaa Bacillus licheniformis -lajin kannat.

ESPERASE™ ja SAVINASE™ -proteaasit saadaan kasvattamalla alkalofiilisiä Bacillus-kantoja.

5 Esillä olevan keksinnön sisällä oleva kohde on tarjota uusia pesuaineproteaaseja, joilla on parannettu kustannus/tehokkuussuhde.

10 Esillä olevan keksinnön mukaisesti saadaan uusia pesuaine-proteaaseja.

15 Ensimmäisessä näkökulmassa keksintö tarjoaa proteaasin, jonka näennäismolekyylipaino on 38 kD, pI noin 8,8, pH-optimi alueella pH 8 - 11 (25 °C:ssa), lämpötilaoptimi alueella 45-55 °C (pH 9,5:ssä), ja immunokemialliset ominaisuudet, jotka ovat identtiset tai osittain identtiset Bacillus sp. TY 145, NCIMB nro 40339:sta johdetun proteaasin ominaisuuksien kanssa. Spesifisemmässä näkökulmassa proteaasi on saatavilla Bacillus sp. TY 145 -kannasta. Vielä spesifisemmässä näkökulmassa proteaasi on saatavilla Bacillus sp. TY 145:sta, NCIMB nro 40339:sta, tai sen mutantista tai variantista.

25 Toisessa näkökulmassa keksintö tarjoaa Bacillus sp. TY 145 -kannan eristetyn biologisesti puhtaan kasvuston. Spesifisemmässä näkökulmassa tarjotaan Bacillus sp. TY 145, NCIMB nro 40339 -kanta, tai sen mutantti tai variantti.

30 Kolmannessa näkökulmassa keksintö tarjoaa menetelmän proteaasin valmistamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista se, että kasvatetaan proteaasia tuottavaa Bacillus sp. TY 145 -kantaa sopivassa ravintoelatusaineessa, joka sisältää hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, mitä seuraa halutun entsyymin talteenottaminen. Spesifisemmässä näkökulmassa viljellään Bacillus sp. TY 145, NCIMB nro 40339 tai sen mutanttia tai variantia.

35 Neljännessä näkökulmassa patenttivaatimusten kohteena on entsyymin käyttö pesuaine-entsyyminä. Spesifisemmässä näkö-

kulmassa keksintö tarjoaa pesuainekoostumuksen ja pesuainelisiä aineeseen, joka sisältää proteaasia.

5 Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

Esillä olevaa keksintöä valaistaan edelleen viittaamalla liitteenä oleviin piirroksiin, joissa:

10 kuva 1 esittää suhteen lämpötilan ja keksinnön mukaisen entsyymin proteolyyttisen aktiivisuuden välillä (entsyymivalmiste saatu esimerkin 1 mukaisesti, kaseiinin ollessa substraattina ja pH 9,5:ssä); ja
kuva 2 esittää suhteen pH:n ja keksinnön mukaisen entsyymin
15 proteolyyttisen aktiivisuuden välillä (entsyymivalmiste saatu esimerkin 1 mukaisesti, kaseiinin ollessa substraattina ja 25 °C:ssa).

Mikro-organismi

20 Keksinnön mukainen uusi mikro-organismi, joka kykenee tuottamaan keksinnön mukaista entsyymiä, eristettiin Etelänapamantereeseen maaperänäytteestä. Bacillus sp. TY145 on talletettu Budapestin sopimuksen mukaisesti talletuslaitokseen NCIMB numerolla 40339.

25 Tämän keksinnön mukainen mikro-organismi on aerobinen, itiöitä muodostava bakteeri, joka kuuluu sukuun Bacillus. Morfologisesti sitä voidaan kuvata liikkuvina nauhoina, joiden halkaisija on 0,7 - 0,9 mikronia, ja pituudeltaan 2 - 3
30 mikronia. Itiöt ovat pyöreistä ellipsoideihin, eivät laajenna itiöpesäkettä, keskeisestä loppua edeltävään. Optimilämpötila kasvulle on 30-37 °C ja optimi pH kasvulle on 7-9, ei kasvua pH:ssa 9,7, eikä kasvua 50 °C:ssa. Mikro-organismi muodostaa kuivia, valkoisia kasvustoija, joilla on hiusmaisia ulokkeita ravinne agar-levyillä, eikä havaittu pigmentin
35 diffuusiosta agariin.

Mikro-organismien kasvatus

Keksinnön mukaisia mikro-organismeja voidaan kasvattaa
40 aerobisissa olosuhteissa ravintoelatusaineessa, joka si-

sältää assimiloitavissa olevaa hiiltä ja typpeä yhdessä muiden oleellisten ravinteiden kanssa, elatusaineen koostuessa tunnetun tekniikan periaatteiden mukaisesti.

5 Sopivia hiililähteitä ovat hiilihydraatit kuten sakkaroosi, glukoosi ja tärkkelys, tai hiilihydraattia sisältävät aineet kuten soijapavut, puuvillansiemenjauho, maissijyvät, mallas, riisi ja durra. Hiilihydraattikonsentraatio, joka
10 jopa ylös 25 %:iin ja alas 1-5 %:iin, mutta tavallisesti 8-10 % on sopiva, prosenttiosuuksien ollessa laskettu glukosiekvivalentteina.

Ravinne-elatusaineessa oleva typpilähde voi olla epäorgaaninen ja/tai orgaaninen luonteeltaan. Sopivia epäorgaanisia
15 typpilähteitä ovat nitraatit ja ammoniumsuolat. Orgaanisten typpilähteiden joukosta useita käytetään säännöllisesti fermentointiprosesseissa. Havainnollistavia esimerkkejä ovat soijapapujauho, puuvillansiemenjauho, maapähkinäjauho,
20 kaseiini, vilja, viljan liotus neste, hiivauute, urea ja albumiini. Lisäksi ravinne-elatusaineen pitäisi sisältää myös tavallisia hivenaineita.

25 Tämän keksinnön uudet Bacillus-lajit ovat heikosti alkalofiilisiä. Siten kasvatus suoritetaan edullisesti heikosti emäksisissä pH-arvoissa, jotka voidaan savuttaa lisäämällä sopivia puskureita kuten natriumkarbonaatti, pH 9,0, kasvuelatusaineen sterilisoinnin jälkeen. Tankkifermentoreissa kasvatusta varten on tarpeellista käyttää keinotekoisia
30 ilmastusta. Ilmastuksen nopeus on samanlainen, jota käytetään tavanomaisessa tankkifermentoinnissa.

35 Fermentoinnin jälkeen nestemäiset entsyymikonsentraatit voidaan tuottaa poistamalla raaka-aine liemestä tai haluttaessa liemen konsentroinnilla haihduttamalla alhaisessa lämpötilassa tai käänteisosmoosilla. Lopuksi konsentraattiin voidaan lisätä säilöntäaineita.

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

Proteolyyttisen aktiivisuuden analyysi

Proteolyyttinen aktiivisuus määritetään kasiini substraattina. Yksi kaseiiniproteaasiyksikkö, Casein Protease Unit (CPU) määritetään sen entsymin määränä, joka vapauttaa 1 mM primaarisia aminoryhmiä (määritettynä vertailuna seriinistandardin kanssa) minuuttia kohti standardiolosuhteissa, so. 30 minuutin inkubointi 25 °C:ssa ja pH:ssa 9,5. Kansio AF 228, kuvaten analyttisen menetelmän, on saatavilla pyydetessä firmasta Novo Nordisk A/S, Tanska, joka kansio sisällytetään tähän viitteenä.

Entsyymi

Keksinnön mukainen entsyymi on uusi pesuaineproteaasi. Se on emäksinen proteaasi, jota saadaan kasvattamalla keksinnön mukaista mikro-organismia, edullisesti *Bacillus* sp. TY145, NCIMB nro 40339, tai sen mutanttia tai varianttia, sopivassa ravintoelatusaineessa, joka sisältää hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja. Entsyymi voidaan saada myös yhdistelmä-DNA-tekniikalla.

Keksinnön mukainen proteaasi voidaan kuvata seuraavilla tunnuspiirteillä.

Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

Molekyylipaino 38 kD, määritettynä SDS-PAGElla. pI 8,8 määritettynä isoelektrisellä fokusoimisella LKB Ampholine® PAG-levyillä. Proteaasiaktiivisuutta inhiboi PMSF, α -1-antitrypsiini ja kalkkunan munanvalkuaisen proteinaasi-inhibiittori. EDTA ja soijapapuproteiini-inhibiittori eivät vaikuttaneet proteaasiaktiivisuuteen.

Lämpötila-aktiivisuus-suhde määritettiin kaseiini substraattina. Edellä kuvattua proteolyyttisen aktiivisuuden analyysiä käytettiin sellaisella muutoksella, että inkubaatiolämpötilaa vaihdeltiin 15-70 °C intervallein. Tulos on esitetty kuvassa 1. Entsyymillä on proteolyyttistä aktiivisuutta lämpötiloissa alle 15 °C:sta yli 70 °C:een, ja lämpötilaoptimi rajoissa 45-55 °C, noin 50 °C.

Aktiivisuuden riippuvuus pH:sta määritettiin samalla menetelmällä käyttämällä puskureita, jotka säädettiin edeltä määrättyihin pH-arvoihin pH-alueella 6-11. Tulokset on esitetty kuvassa 2. Entsyymillä on proteolyyttistä aktiivisuutta pH-arvoissa alle 6:sta yli 11:een, pH-optimin ollessa alueella pH 8 - pH 11, noin pH 10.

Keksinnön mukainen proteaasi on stabiili 60 minuuttia 40 °C:ssa ja pesuolosuhteissa eurooppalais- tai amerikkalais-tyyppisissä pesuaineissa.

20 Immunokemialliset ominaisuudet

Immunokemialliset ominaisuudet voidaan määrittää immunologisesti ristireaktio-identitettikokeilla. Identiteettiko-
 keet voidaan suorittaa hyvin tunnetulla Ouchterlony kaksoisimmunodifuusiomenettelyllä tai kaksoisristi-immunoelektroforeesilla teoksen Axelsen, N. H.; Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques; Blackwell Scientific Publications (1983), luvut 5 ja 14, mukaisesti. Termit "antigeeninen identtisyys" ja "osittainen antigeeninen identtisyys" kuvataan samassa kirjassa, luvut 5, 19 ja 20.

30 Monospesifinen antiseerumi kehitettiin edellä kuvatun menetelmän mukaisesti immunisoimalla kaniineja keksinnön mukaisella puhdistetulla proteaasilla. Immunogeeni sekoitettiin Freundin apuaineen kanssa ja injektointiin ihonalaisesti kaniineihin joka toinen viikko. Antiseerumia saatiin 8 viikon kokonaisimmunisaatiojakson jälkeen ja immunoglobuliini valmistettiin siitä kuten on kuvattu viitteessä N. H. Axelsen, edellä.

Ouchterlony-kaksoisimmunodiffuusiokokeet eivät osoittaneet ristireaktiota keksinnön mukaisen proteaasin ja tunnettujen emäksisten seriiniproteaasien ALCALASE™, ESPERASE™ ja SAVINASE™, subitilisin BPN' ja KAZUSASE™ välillä.

5

Pesuaineekoostumukset

Keksinnön mukainen pesuaineekoostumus voi käsittää yhtä tai useampaa pinta-aktiivista ainetta, joka voi olla tyypiltään anionista, ionitonta, kationista, amfoteerista tai kaksois-
10 ionista tai näiden seosta. Tyypillisiä esimerkkejä anionista pinta-aktiivisista aineista ovat lineaariset alkyylibentseenisulfonaatit (LAS), alkyyლისulfaatit (AS), aflaolefiinisulfonaatit (AOS), alkoholietoksisulfaatit (AES) ja luonnollisten rasvahappojen alkalimetallisuolat. Esimerkke-
15 jä ionittomista pinta-aktiivisista aineista ovat alkyyli-
polyetyleeniglykolieetterit, nonyylifenolipolyetyleeniglykolieetterit, sakkaroosin ja glukoosin rasvahappoesterit, polyetoksyloitujen alkyyli-glukosidien esterit.

20

Keksinnön mukainen pesuaineekoostumus voi sisältää myös muita pesuaine-ainesosia, jotka tunnetaan tekniikan tasossa, kuten bilderit, valkaisuaineet, valkaisuaktivaattorit, korroosionestoaineet, sekvesterointiaineet, sakkauman uudelleenkerrostumisen estoaineet, parfyymit, entsyymien ja
25 valkaisuaineiden stabilisaattorit, formulaatiohapot, optiset kirkastajat, vaahdon voimistajat, kelatointiaineet, täyteaineet, kankaan pehmentäjät jne. Keksinnön mukainen pesuaineekoostumus voidaan formuloida oleellisesti kuten J. Falbe on kuvannut [Falbe, J.; Surfactants in Consumer
30 Products. Theopry, Technology and Application; Springer Verlag 1987, katso erityisesti osa, jonka otsikkona on "Frame formulations for liquid/powder heavy-duty detergents"].

35

Tällä hetkellä ollaan siinä käsityksessä, että keksinnön mukainen pesuaineekoostumus voi sisältää entsyymivalmistetta määrässä, joka vastaa 0,0005-0,5 CPU:ta proteolyyttistä entsyymiä pesuliuoksen litraa kohti.

Keksinnön mukaiset pesuainekoostumukset voidaan formuloida mihin tahansa tarkoituksen mukaiseen muotoon, kuten jauheet, nesteet jne.

5 Keksinnön mukainen pesuainekoostumus voi edullisesti sisältää yhtä tai useampaa muuta entsyymiä, esimerkiksi lipaaseja, amylaaseja, sellulaaseja, oksidaaseja ja/tai peroksidaaseja, jotka tavallisesti kuuluvat pesuainekoostumukseen.

10 Keksinnön mukaiset proteaasit voidaan sisällyttää pesuainekoostumukseen lisäämällä erillisiä lisäaineita, jotka sisältävät pesuaineproteaasin, tai lisäämällä yhdistetty lisäaine, joka käsittää erilaisia pesuaine-entsyymejä.

15 Keksinnön mukainen lisäaine voidaan formuloida esimerkiksi rakeiksi, nesteiksi, lietteiksi jne. Edullisia pesuaineli-säaineformulaatioita ovat polyämättömät rakeet, nesteet, erityisesti stabiloidut nesteet, lietteet tai suojatut entsyymit. Pölyämättömät rakeet voidaan tuottaa esimerkiksi

20 GB-patenttijulkaisun nro 1 362 365 tai US-patentin nro 4 106 991 mukaisesti ja voidaan mahdollisesti päällystää tekniikan tason tunnetuilla menetelmillä. Pesuaine-entsyymit voidaan sekoittaa ennen rakeistusta tai sen jälkeen. Nestemäiset entsyymivalmisteet voidaan esimerkiksi stabi-

25 loida lisäämällä polyolia kuten esimerkiksi propyleeniglykolia, sokeria tai sokerialkoholia, maitohappoa tai boori-happoa, vakiintuneiden menetelmien mukaisesti. Muut entsyymistabilisaattorit ovat hyvin tunnettuja tekniikan tasossa. Suojatut entsyymit voidaan valmistaa EP-patenttijulkaisussa

30 238 216 esitetyn menetelmän mukaisesti.

Käyttökelpoisessa toteutusmuodossa keksinnön mukainen proteaasi voidaan liittää puhdistuaineformulaatioihin esimerkiksi EP-patenttijulkaisujen 342 177, 368 575, 378 261 ja

35 378 262 mukaisesti.

Keksintöä valaistaan seuraavissa esimerkeissä, joiden ei tarkoiteta millään tavalla rajoittavan patenttivaatimuksissa esitetyn keksinnön piiriä.

5 **Esimerkki 1**

Viljelyesimerkki

Bacillus sp. TY145:ttä viljeltiin 25 °C:ssa pyöröravistus-
pullossa (300 rpm) 500 ml:n Erlenmeyerpulloissa, jotka si-
sälsivät 100 ml elatusainetta, jolla oli seuraava koostumus
10 (litraa kohti):

	Perunatärkkelys	100 g
	Jauhettu ohra	50 g
	Soijapapujauho	20 g
15	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	9 g
	Pluronic®	0,1 g
	Natriumkaseinaatti	10 g

Elatusaineessa oleva tärkkelys nesteytetään α-amylaasilla
20 ja elatusaine steriloidaan kuumentamalla 120 °C:ssa 45
minuuttia.

25 Steriloinnin jälkeen elatusaineen pH säädetään 9,0:ään
lisäämällä 10 ml 1 M natriumbikarbonaatin liuosta.

5 päivän inkuboinnin jälkeen viljelmän proteolyyttinen
aktiivisuus määritettiin käyttämällä edellä kuvattua mene-
telmää.

30 Kasvatuksen jälkeen liemen entsyymiaktiivisuus oli 10
CPU/l.

Kiinteän aineen erottamisen jälkeen proteaasi puhdistet-
tiin tavanomaisella kromatografisella menetelmällä.

35 Saanto 1 l:n kasvustoliemestä oli 50 ml, jonka aktiivisuus
oli 57 CPU/l. Puhtaus oli enemmän kuin 90 % kuten määri-
tettiin SDS-PAGElla.

Tämän esimerkin mukaisesti valmistetun valmisteen tunnuspiirteisiin on viitattu aikaisemmin tässä selityksessä ja tässä viitataan aikaisempaan kohtaan.

5 Esimerkki 2

Pesuteho

Pesutehokokeet suoritettiin ruoholla tahratulla puuvillalla, mallipesusysteemissä 20 °C:ssa, isoterminen 10 minuuttia.

10

Tässä kokeessa käytettiin 2,0 g/l amerikkalaistyyppistä jauhepesuainekoostumusta. Pesuaine ei sisältänyt mitään entsyymiä ennen keksinnön mukaisen proteaasin lisäämistä. Pesuaine liuotettiin noin 6° dH (saksalainen kovuus) veteen ja pH oli noin 8. Tekstiili/pesuneste-suhde oli noin 6 g tekstiiliä pesuaineliuoksen litraa kohti. Esimerkin 1 mukaista entsyymivalmistetta käytettiin entsyymiproteiininikonsentraatioissa 0,01; 0,04; 0,08; 0,16 ja 0,5 CPU/l.

15

20

Pesun jälkeen kangasta huuhdottiin juoksevassa vesijohtovedessä 25 minuuttia ja ilma kuivattiin. Proteaasin tehokkuus määritettiin remission (%R) muutoksena (ΔR) 460 nm:ssä mitattuna laitteella Datacolor Elrephometer 2000, Δ :n ollessa remissio proteaasilisäyksellä pesun jälkeen miinus remissio pesun jälkeen ilman proteaasin lisäystä.

25

Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

30

<u>Entsyymikonsentraatio</u>		<u>delta R</u>
0,01	CPU/l	4
0,04	CPU/l	6,7
0,08	CPU/l	8,7
0,16	CPU/l	9,7
0,50	CPU/l	11,2

35

Differentiaaliset remissioarvot osoittavat, että keksinnön mukaisella proteaasilla on hyvä pesukyky.

Esimerkki 3Pesuaineiden stabiilisuus

5 Keksinnön mukaisen entsyymin (entsyymivalmiste saatu esi-
merkin 1 mukaisesti) stabiilisuus testattiin pesuaineiden
läsnaollessa. Pesuaineet, joita käytettiin tässä, olivat
amerikkalaistyyppinen jauhepesuaine ja amerikkalaistyyppi-
nen nestepesuaine.

10 Jäännösaktiivisuus mitattiin 60 minuutin jälkeen 40 °C:ssa.
Entsyymiannos oli 0,3 COU/l.

		Jäännösaktiivisuus
Jauhepesuaine:	0,9 g/l	100 %
Nestepesuaine:	2,0 g/l	95 %

15

Tämä koe osoittaa, että proteaasi on stabiili pesuaineissa
pesuolosuhteissa.

International Application No: PCT/ /

MICROORGANISMS	
Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page <u>1</u> , line <u>3</u> of the description ¹	
A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT ¹	
Further deposits are identified on an additional sheet ☐ ²	
Name of depositary institution ⁴ NATIONAL COLLECTIONS OF INDUSTRIAL & MARINE BACTERIA LTD.	
Address of depositary institution (including postal code and country) ⁴ 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland	
Date of deposit ⁴ 3 December 1990	Accession Number ⁴ NCIMB 40339
B. ADDITIONAL INDICATIONS ³ (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet ☐	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited micro-organism will be made available only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC) until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or is deemed to be withdrawn.	
C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE ³ (if the indications are not for all designated States)	
D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS ³ (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later ³ (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit") 	
E. ☒ This sheet was received with the international application when filed (to be checked by the receiving Office)  (Authorized Officer) ☐ The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau is was _____ (Authorized Officer)	

Patenttivaatimukset

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

- 5 (a) näennäismolekyyllipaino 38 kD SDS-PAGE:lla määritettynä;
(b) pI noin 8,8;
(c) pH-optimi pH-alueella 8-11 määritettynä 25 °C:ssa;
(d) lämpötilaoptimi alueella 45-55 °C määritettynä pH 9,5:ssä;

- 10 (e) immunokemialliset ominaisuudet, jotka ovat identtisiä tai osittain identtisiä sellaisen proteaasin ominaisuuksien kanssa, jotka ovat saatavissa *Bacillus* sp. TY145:stä, NCIMB nro 40339, ja että proteaasi voidaan saada viljelemällä *Bacillus* sp. TY145:ta, NCIMB nro 40339.

15

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteaasi, **tunnettu** siitä, että proteaasi saadaan *Bacillus* sp. TY145 -kannasta, NCIMB nro 40339.

20

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen proteaasi, **tunnettu** siitä, että sen aktiivisuutta inhiboi fenyyylimetyylisulfonylfluoridi-(PMSF), α -1-antitrypsiini- ja kalkkunan munanvalkuaisen proteinaasi-inhibiittori.

25

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen proteaasi, **tunnettu** siitä, että sillä on aktiivisuutta etyleenidiamiinitetra-asetatin (EDTA) ja soijapapuproteiini-inhibiittorin läsnä ollessa.

30

5. *Bacillus* sp. TY145 -kannan eristetty, biologisesti puhdas viljelmä NCIMB nro 40339.

35

6. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaisen proteaasin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että viljellään proteaasia tuottavaa *Bacillus* sp. TY145 -kantaa NCIMB nro 40339 sopivassa elatusaineessa, joka sisältää hiili- ja typipilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, mitä seuraa halutun entsyymin talteenottaminen.

7. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaisen proteaasin käyttö pesuaine-entsyyminä.

5 8. Puhdistusainekoostumus, **tunnettu** siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaista proteaasia.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen puhdistusainekoostumus, **tunnettu** siitä, että se sisältää lisäksi yhtä tai useampaa muuta entsyymiä, erityisesti amylaaseja, lipaaseja, sellulaaseja, oksidaaseja ja/tai peroksidaaseja.

10. Puhdistusainelisiäaine, **tunnettu** siitä, että se käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaista proteaasia, polyämättömien rakeiden, nesteen, erityisesti stabiloidun nesteen, lietteen tai suojatun entsyymin muodossa.

Patentkrav

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

a) skenbar molekylvikt 38 kD bestämd med SDS-PAGE;

b) pI ca 8,8;

c) pH-optimum inom området pH 8-11 bestämd vid 25 °C;

d) temperaturoptimum inom området 45-55 °C bestämd i pH 9,5;

25 e) immunokemiska egenskaper, vilka är identiska eller delvis identiska med egenskaperna hos ett proteas som kan erhållas ur Bacillus sp. TY145, NCIMB nr 40339, och att proteasen kan erhållas genom odling av Bacillus sp. TY145, NCIMB nr 40339.

30 2. Proteas enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att det erhålls ur stammen Bacillus sp. TY145, NCIMB nr 40339.

3. Proteas enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att dess aktivitet inhiberas av fenylmetylsulfonylfluorid-(PMSF), α -1-antitrypsin- och kalkons äggvitas proteinas-inhibitor.

4. Proteas enligt patentkrav 1, 2 eller 3, **kännetecknat** av att det har aktivitet i närvaro av etylendiamintetra-acetat (EDTA) och sojabönaprotein-inhibitor.

5. Isolerad biologiskt ren odling av Bacillus sp. TY145, NCIMB nr 40339.

5 6. Förfarande för framställning av ett proteas enligt vilket som helst patentkrav 1-4, **kännetecknat** av att man vid förfarandet odlar en proteasproducerande stam av Bacillus sp. TY145, NCIMB nr 40339 i ett lämpligt näringsmedium som innehåller kol- och kvävekällor samt oorganiska salter, varefter det önskade enzymet tas tillvara.

10

7. Användning av ett proteas enligt vilket som helst patentkrav 1-4 som tvättmedelsenzym.

15

8. Tvättmedelssammansättning, **kännetecknad** av att den innehåller proteas enligt vilket som helst patentkrav 1-4.

20

9. Tvättmedelssammansättning enligt patentkrav 8, **kännetecknad** av att den innehåller dessutom ett eller flera andra enzym, i synnerhet amylaser, lipaser, cellulaser, oxidaser och/eller peroxidaser.

25

10. Tvättmedelstillfällsämne, **kännetecknat** av att det innefattar ett proteas enligt vilket som helst patentkrav 1-4 i form av icke-dammande granulat, vätska, i synnerhet en stabiliserad vätska, som slurry eller ett skyddat enzym.

1/1

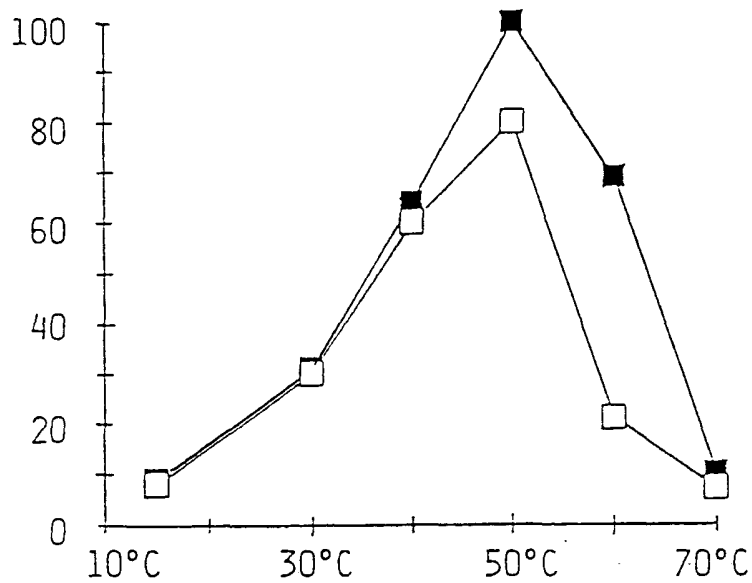


Fig. 1

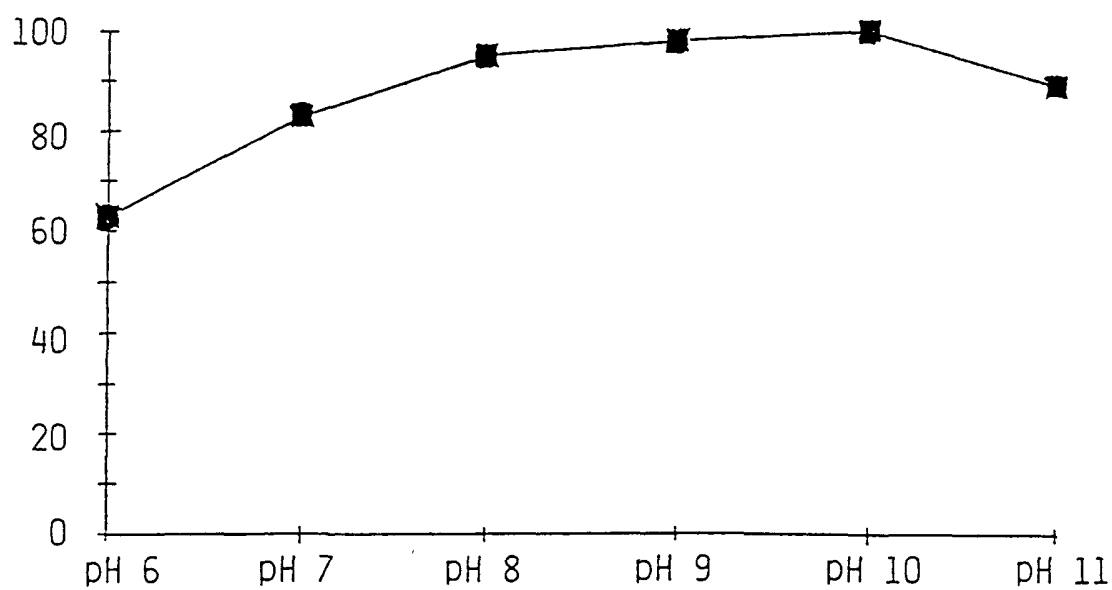


Fig. 2