



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT



(10) FI 115840 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

29.07.2005

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

C12N 9/42, D06M 16/00, C11D 11/00, 3/386, 7/42
C12S 11/00 // D06M 101:06

(21) Patentihakemus - Patentansökning

955909

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

08.12.1995

(24) Alkuperä - Löpdag

30.11.1993

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

08.12.1995

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US93/11555

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

11.06.1993 US 075657 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Genencor International, Inc., 180 Kimball Way, South San Francisco, CA 94080, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Clarkson, Kathleen A., 53 28th Street, San Francisco, CA 94110, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Lad, Pushkaraj J., 137 Seagate Drive, San Mateo, CA 94403, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Mullins, Margaret M., 895 George Street, Montara, CA 94037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Simpson, Curran, 895 George Street, Montara, CA 94037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Weiss, Geoffrey L., 275 Grattan Street #6, San Francisco, CA 94117, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

6 •Jacobs, Lindsay, 1513 Birch avenue, San Mateo, CA 94402, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Ensymaattisten koostumusten käyttö ja menetelmiä kivipestyn ulkonäön tuottamiseksi indigovärjätyle denimkankaalle
Användningen av enzymatiska kompositioner och förfaranden för att åstadkomma stentvättat utseende på indigofärgat denimtyg

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

GB 2094826 A, US 4566985 A, US 4760025 A, WO 90/07569 A, WO 92/17574 A, WO 91/05841 A, WO 92/06183

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Denimkankaan ja/tai -vaatteiden liisterinpoiston ja entsyymaattisen kivipesun aikana tapahtuu usein sinisen värin uudelleenkerrostumista takaisin denimkankaan ja/tai -vaatteiden pinnoille. Keksintö koskee uudelleenkerrostumista tai takaisinvärjäystä estävää koostumusta ja menetelmää, joka vaatii lisätyn proteaasin sisällyttämistä ennen kivipesuprosessia, sen aikana tai sen jälkeen, joka lisätty proteaasi vähentää sinisen värin uudelleenkerrostumista ja parantaa siten kivipesuprosessia käytettäessä uudelleenkerrostus- tai takaisinvärjäyssellulaaseja tuottaen ulkonäön, joka on lähempänä ulkonäköä, joka saadaan käyttämällä kivipesuprosessissa pelkästään kiviä tai uudelleenkerrostus-sellulaaseja.

Under klisteravlägsningen och den enzymatiska stentvätten av denimtyg och/eller kläder sker ofta återdeposition av den blåa färgen på ytan av denimtyget och/eller -kläderna. Uppfinningen avser en återdeposition eller återfärgning förhindrande komposition och ett förfarande, vilket erfordrar inkorporering av tillsatt proteas före stentvättsprocessen, under denna eller efter denna, varvid det tillsatta proteaset minskar återdepositionen av den blåa färgen och förbättrar sålunda stentvättsprocessen vid användning av återdepositions- eller återfärgningscellulaser, varvid man erhåller en produkt som mera liknar det som erhålles då man vid stentvättsprocessen använder endast stenar eller återdepositionscellulaser.

ENTSYMAATTISTEN KOOSTUMUSTEN KÄYTTÖ JA MENETELMIÄ KIVIPESTYN ULKONÄÖN TUOTTAMISEKSI INDIGOVÄRJÄTYLLE DENIMKANKAALLE

RISTIVIITTAUS LIITTYVIIN HAKEMUKSIIN

Tämä patenttihakemus on jatkohakemus US-patenttihakemukselle sar-
5 janro 08/075 657, jätetty 11. kesäkuuta 1993, joka on jatkohakemus US-
patenttihakemukselle sarjanro 07/897 721, jätetty 12. kesäkuuta 1992.

KEKSINNÖN ALA

Tämä keksintö koskee koostumusten käyttöä ja menetelmiä vähentää
tai estää sinisen indigovärin takaisinvärjäystä denimille denimkankaan ja -
10 vaatteiden kivipesun aikana sellulaasientsyymejä käyttäen.

KEKSINNÖN TAUSTA

Denim on puuvillakangasta, joka on värjätty, tavallisesti siniseksi, indi-
govärillä. Yksi indigovärjätyn denimkankaan haluttava ominaispiirre on värjättyjen
lankojen vuorottelu valkoisten lankojen kanssa, mikä normaalissa käytössä ja ku-
15 lutuksessa antaa denimille ulkonäön, jossa on valkoista sinisellä. Eräs denimin
suosittu ulkonäkö on kivipesty vaikutelma. Perinteisesti kivipesu on suoritettu pe-
semällä denimmateriaali hohkakiven läsnä ollessa, mistä on tuloksena kangas,
jolla on haalistunut tai kulunut ulkonäkö edellä kuvatulla valkoinen-
sinisellä-kontrastivaikutelmalla. Tämä kivipesty ulkonäkö koostuu pääasiassa vä-
20 rin poistumisesta tavalla, joka antaa tulokseksi materiaalia, jossa oli alueita, jotka
ovat väriltään vaaleampia säilyttäen halutun valkoinen-sinisellä-kontrastin, ja ma-
teriaalia, joka on rakenteeltaan pehmeämpää.

Denimkankaan käsittelyssä käytetään nykyisin entsyymejä, erityisesti
sellulaaseja. Erityisesti sellulaaseja on käytetty hohkakivien korvikkeena tai yhdis-
25 telmänä hohkakivien kanssa perinteiseen "kivipesu"-prosessiin, jota käytetään
haalistuneen ulkonäön antamiseksi denimille. Entsyymien käytön suosio kivi-
pesussa on kasvanut, koska kivien yksinään käytöllä on useita haittoja. Proses-
sissa käytetyt kivet aiheuttavat esimerkiksi koneiston kulumista ja rikkoutumista,
ne aiheuttavat ympäristöllisiä jäteongelmia muodostuneesta kivijauhosta johtuen,
30 ja aiheuttavat korkeat työkustannukset, jotka liittyvät kivien manuaaliseen pois-
toon vaatteiden taskuista. Näin ollen kivien vähentäminen tai poistaminen pesus-
sa voi olla toivottavaa.

Vastakohtana hohkakivien käytölle entsyymit (erityisesti sellulaasit)
ovat turvallisia koneelle, aiheuttavat vähän tai ei lainkaan jäteongelmaa ja vähen-

tävät työkustannuksia drastisesti. Sen vuoksi voi olla eduksi käyttää kivipesuun entsyymejä. Vaikka entsyymien, kuten sellulaasin, käyttö voi olla edullista kivien yksinään käyttöön verrattuna, liittyy entsyymien tähän tarkoitukseen käyttöön kuitenkin joitain ongelmia. Esimerkiksi yhtä joidenkin sellulaasien, kuten Trichoderma-
5 masta olevien sellulaasien, ongelmaa voitaisiin kuvata värin epätäydellisenä poistona, jota aiheuttaa jonkin suuruisen värimäärän "uudelleenkerrostuminen" tai "takaisinvärjäys" (molempia käsitteitä käytetään tässä keskenään vaihdettavasti) kankaalle entsyymattisen kivipesuprosessin aikana. Sellainen uudelleenkerrostus tai takaisinvärjäys aiheuttaa pinnalle sinivärjäystä, mistä on seurauksena vähäi-
10 sempi sinisten ja valkoisten lankojen välinen kontrasti ja hankauspisteitä (ts. sinistä-sinisellä-ulkonäkö edullisen valkoinen-sinisellä-ulkonäön sijasta). Katso julkaisua American Dyestuff Reporter, syyskuu 1990, s. 24 - 28.

Uudelleenkerrostus tai takaisinvärjäys on vastenmielistä eräille käyttäjille. Vaikka Trichoderma-sellulaaseilla tapahtuu takaisinvärjäystä, ne ovat edullisia verrattuna Humicola-sellulaaseihin, joilla ei yleensä ole takaisinvärjäystä, johon
15 tuen Trichoderma-sellulaaseilla nähdystä suuremmasta spesifisestä aktiivisuudesta denimmateriaalilla. Lisäksi keksinnössä voivat olla eduksi korkeamman puhtausasteen omaavat sellulaasit. Korkeasta spesifisestä aktiivisuudesta tai korkeasta puhtausasteesta voi myös olla seurauksena korkeampi hankausaste merkittävästi lyhyemmissä käsittelyajoissa, ja ne ovat sen vuoksi denimkankaan valmistajien suosiossa.
20

Värin uudelleenkerrostumisen ongelma kivipesun aikana on denimkankaanvalmistajien eräs huolenaihe. Aikaisempia yrityksiä ongelman ratkaisemiseksi ovat mm. ylimääräisten uudelleenkerrostuksenestokemikaalien, kuten surfaktanttien, tai muiden aineiden lisääminen sellulaasipesuun irronneen indigovärin dispergoimisen auttamiseksi ja uudelleenkerrostumisen vähentämiseksi. Lisäksi denimkankaanvalmistajat ovat kokeilleet denimiä kohtaan vähemmän spesifisen aktiivisuuden omaavien sellulaasien käyttöä yhdessä ylimääräisten huuhtelujen kanssa. Tästä on tuloksena lisää kemikaalikustannuksia ja pitemmät käsittelyajat. Erääseen toiseen menetelmään, jolla uudelleenkerrostusongelmaa yritetään ratkaista, sisältyy lievän valkaisuaineen tai tahrannoistoaaineen lisääminen prosessiin. Tämä menetelmä vaikuttaa vaatteiden lopulliseen värisävyyn ja pidentää käsittelyaikaa.
30

Vaikka nämä menetelmät auttavat jossain rajallisessa asteessa uudelleenkerrostuksen vähentämisessä, eivät menetelmät ole täysin tyydyttäviä, ja jonkin verran ei-hyväksyttävää takaisinvärjäystä tapahtuu edelleen. Entsyymien ja ki-
35

vien käyttö yhdessä voi olla edullista tämän uudelleenkerrostumisongelman voittamiseksi; valmistajalle jää kuitenkin joitain kivien yksinään käyttöön liittyviä ongelmia.

Uudelleenkerrostuksen vähentämiseksi tai estämiseksi aikaisemmin yritettyjen menetelmien heikkouksien perusteella on tarvetta ympäristöllisesti suotuisammille ja kustannustehokkaammille menetelmille kivipesukäsittelyn aikaisen värin uudelleenkerrostus- tai takaisinvärjäyskysymyksen ratkaisemiseksi.

Niinpä olisi toivottavaa keksiä entsyymaattinen koostumus tai menetelmä, joka lisää värin poistoa kivipesun aikana käytettäessä uudelleenkerrostavia tai takaisinvärjääviä sellulaaseja, joilla, vaikka tapahtuu takaisinvärjäystä, on korkea spesifisen aktiivisuuden aste denimmateriaalilla.

PIIRUSTUKSET

Kuviossa 1 esitetään kaavio suhteellisen heijastuskyvyn mittauksista kivipesusta uudelleenkerrostavalla sellulaasilla ja erilaisilla lisätyillä proteaaseilla, esimerkeissä 1, 2 ja 3 kuvatulla tavalla verrattuna kontrolliin uudelleenkerrostavalla sellulaasilla.

Kuviossa 2 esitetään kaavio suhteellisen heijastuskyvyn mittauksista kivipesusta uudelleenkerrostavalla sellulaasilla ja erilaisilla lisätyillä proteaaseilla verrattuna kontrolliin uudelleenkerrostavalla sellulaasilla, esimerkissä 4 esimerkkinä kuvatulla tavalla.

KEKSINNÖN YHTEENVETO

Keksinnön hakijat ovat keksineet, että indigovärjätyn puuvilladenimkankaan käsittely tehokkaalla määrällä uudelleenkerrostumisen tai takaisinvärjäytymisen estävää koostumusta, joka käsittää uudelleenkerrostavaa sellulaasikoostumusta ja lisättyä proteaasia, jota on ylimäärä verrattuna määriin, joita on luonnollisesti läsnä luonnollisen organismin tuottamassa uudelleenkerrostavassa sellulaasivalmisteesta, on parannus verrattuna uudelleenkerrostavaan sellulaasiin yksinään menetelmänä väriä vaihtelujen lisäämiseksi indigovärjätyn denimkankaan pinnalle. Sellaisella koostumuksella käsittelyn tulos on valkoisten ja sinisten lankojen välisen kontrastin paraneminen saavuttaen värin täydellisemmän poiston (enemmän hohkakivillä saavutetun tuloksen tyyppinen). Kontrastin paraneminen johtuu värin uudelleenkerrostuksen vähenemisestä antaen tulokseksi hankauspisteitä, jotka ovat selväpiirteisempiä ja joilla on suurempi valkoisten ja sinisten rihmojen välinen kontrasti, antaen ylivoimaisen kivipestyyn ulkonäön. Tässä kuvattuihin koostumuksiin tai menetelmiin voidaan mahdollisesti lisä-

tä pieni prosenttiosuus pinta-aktiivista kemiallista surfaktanttia. Pinta-aktiivista ainetta lisättäessä sitä voidaan lisätä joko sellulaasin ja proteaasin kanssa pesussa tai proteaasin kanssa jälkikäsittelyhuuhteluna proteolyyttisen vaikutuksen parantamiseksi.

5 KEKSINNÖN YKSITYISKOHTAINEN KUVAUS

Denimkankaalla, joka on kivipesty lisäämällä sellulaasikäsittelyn aikana tehokas määrä lisättyä proteaasia uudelleenkerrostavan sellulaasin kanssa, nähdään takaisinvärjäystason dramaattinen aleneminen ja valkoisten ja sinisten lankojen välisen kontrastin näkyvä kasvu, ts. täydellisempi kivipesuvaikutus.

10 Vaikka keksinnön hakija ei tahdo pitäytyä mihinkään erityiseen teoriaan, tämän yksi mahdollinen selitys voisi olla, että määrätyt komponentit, jotka ovat läsnä uudelleenkerrostavan sellulaasin koostumuksissa (katso alla olevaa määritelmää), jotka käsittävät seoksia useista entsyymeistä, voivat sitoutua lujasti denimkankaan pinnalle. Nämä komponentit voivat myös sitoa värillä värjättyjä sellulaasifragmenteja ja/tai itse väriä sitoen siten värilliset materiaalit tai värin takaisin kankaaseen.

15 Lisätyn proteaasin lisäys poistaa tehokkaasti sellulaasiproteiineja tai estää sellulaasiproteiineja tehokkaasti sitomasta värillisiä partikkeleita takaisin denimkankaan pinnalle ja silti se ei, hämmästyttävästi, vaikuta haitallisesti tulokseksi saatuun, sellulaasin vaikutuksen aiheuttamaan hangattuun ulkonäköön.

20 Ennen keksinnön yksityiskohtaisempaa käsittelyä määritellään seuraavat käsitteet.

Käsite "lisätty proteaasi" viittaa proteaasin differentiaaliseen määrään mikro-organismien luonnollisesti tuottamaan määrään verrattuna. Tämä differentiaalinen määrä antaa tulokseksi takaisinvärjäyksen vähenemisen lisättäessä uudelleenkerrostavaan sellulaasikoostumukseen kivipesuprosessin aikana.

25 Edullisesti sellainen differentiaalinen määrä on ainakin 1 %:n enemmän kuin kokonaisproteaasiproteiinimäärä, joka luonnollisesti esiintyy uudelleenkerrostavaa sellulaasikoostumusta tuottavassa mikro-organismissa. Lisätyn proteaasin määrän määräävät useat tekijät, kuten esimerkiksi lisätyn proteaasin puhtaus, aktiivisuus ja spesifisyys. Tämän vuoksi lisätyn proteaasin differentiaalinen määrä vaihtelee uudelleenkerrostavan sellulaasikoostumukseen lisätyn proteaasin tyyppin mukaan.

"Lisätty proteaasi" tässä käytettäessä voi olla peräisin joko ulkoisista tai sisäisistä lähteistä. Lisätty ulkoinen proteaasi viittaa niihin proteiineja hajottaviin proteaaseihin, jotka on johdettu tai kehitetty ulkopuolisesti mikro-organismien sellulaasikoostumuksessa luonnollisesti läsnä olevista proteaaseista. Vaihtoeht-

35

toisesti lisätty proteaasi voi olla sisäistä. Tässä tapauksessa lisätyt sisäiset proteaasit viittaavat uudelleenkerrostavassa sellulaasikoostumuksessa olevaan proteaasin määrään, joka on suurempi kuin mikro-organismien luonnollisesti tuottama luonnollisesti esiintyvää proteaasia koodittavan geenin yliekspressiolla. Proteaasia koodittavan geenin yliekspressiolla tuotettu lisääntyneen proteaasin määrä on määrä, joka antaa tulokseksi takaisinvärjäyksen estymisen tai vähenemisen kivipesuprosessissa. Edullisesti lisäys on ainakin 1 %:n suurempi kuin mikro-organismissa luonnollisesti esiintyvä proteaasin määrä.

Proteaaseja on saatavissa useista lähteistä, joita ovat mm. mikrobialiset-, kasvi- ja eläinlähteet, ja ne on kirjallisuudessa hyvin dokumentoitu. Joitain tärkeitä kaupallisia proteolyttisiä lähteitä ovat mm. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* ja *Aspergillus oryzae*. Keksintöä varten sopivia proteaaseja ovat esimerkiksi seriini-, metallo- ja happoproteaasit, samoin kuin endo- ja eksoproteaasit. Subtilisiinit ovat seriiniproteaaseja, jotka toimivat yleensä proteiinien ja peptidien sisäisiä peptidisidoksia katkaisten. Metalloproteaasit ovat ekso- tai endoproteaaseja, jotka vaativat aktiivisuutta varten metallikofaktoria. Yksi edullisista seriiniproteaaseista on subtilisiini. Erityisen edullisia proteaaseja, jotka ovat keksinnössä käyttökelpoisia, ovat proteaasit, jotka saadaan mikro-organismista, jota on modifioitu geneettisesti tavoilla, jotka kuvataan US-patenttijulkaisussa 4 760 025 ja 5 185 258, jotka molemmat liitetään tähän viitteeksi.

Käsite "sellulaasikoostumus" käsittää yhtä tai useaa luonnollisesti esiintyvän mikro-organismien tuottamaa ekso-sellobiohydrolaasi- (CBH), endoglukonaasi- (EG) ja β -glukosidaasi (BG) -komponenttia, jolloin kutakin näistä komponenteista esiintyy mikro-organismien luonnollisesti tuottamassa suhteessa, ja jota tässä toisinaan kutsutaan "täydelliseksi tai luonnolliseksi sellulaasikoostumukseksi".

Otetaan huomioon, että keksinnön mukaisessa käytössä sellulaasikoostumukset voivat sisältää myös sellulaasikoostumusta, joka on saatu mikro-organismista, jota on modifioitu geneettisesti, jotta se ylituottaisi, alituottaisi tai olisi tuottamatta yhtä tai useaa sellulaasin CBH-, EG- ja/tai BG-komponenteista. Muut modifioidut sellulaasikoostumukset voivat sisältää katkaistuja sellulaasiproteiineja, jotka sisältävät CBH:iden tai EG:iden joko sitoutumisdomeenin tai ydin-domeenin, tai sen osan tai johdannaisen. Muut esimerkit modifioiduista sellulaasikoostumuksista voivat sisältää sellulaasien tai katkaistujen sellulaasien primäärin sekvenssin glykosyloitumisasteen muutoksia tai aminohap(p)o(je)n korvauksen(ia).

"Uudelleenkerrostuva tai takaisinvärjävä sellulaasi" viittaa tässä käytettäessä niihin sellulaaseihin, esimerkiksi Trichoderma-, joilla on denimkankaan entsyymaattisessa kivipesussa taipumus värjätä kangas uudelleen johtaen epätäydelliseen kivipesuun verrattuna pesuun yksistään kivillä tai sellulaaseilla, joilla ei ole takaisinvärjäystä, kuten Humicolasta olevilla sellulaaseilla. Uudelleenkerrostavat tai takaisinvärjäävät sellulaasit ovat peräisin mikro-organismeista, kuten sienimikro-organismista Trichoderma sp. tai mistä hyvänsä muusta mikro-organismista, joka tuottaa sellulaaseja, joilla on kivipesuprosessissa denimkankaaseen takaisinvärjäys- tai uudelleenkerrostumisvaikutusta.

10 Keksinnön mukaisissa menetelmissä denimkangas saatetaan kontaktiin osittaista tai täydellistä entsyymaattisesti kivipesemistä varten lisätyn proteaasin kanssa, jota on riittävä määrä takaisinvärjäyksen vähentämiseksi ja siten sinisten ja valkoisten kuitujen välisen kontrastin lisäämiseksi. Proteaasi voidaan sekoittaa yhdessä sellulaasin kanssa ja lisätä sitten pesuun, joka sisältää indigovärjättyä denimkangasta, tai molemmat voidaan lisätä erikseen ja suoraan pesuun, tai proteaasi voidaan lisätä sellulaasipesun jälkeen huuhtelusyklissä. Vaihtoehtoisesti proteaasi voidaan lisätä pesusykliin ennen sellulaasin lisäämistä samaan pesusykliin. Olisi huomattava, että sellulaasikivipesukylpy voi sisältää tai olla sisältämättä nestettä aikaisemmasta liisterinpoistovaiheesta.

20 Keksinnön mukaisessa käytössä uudelleenkerrostumista tai takaisinvärjäystä estävät koostumukset sisältävät lisättyjä proteaaseja ja uudelleenkerrostav(a/i)a sellulaas(ia/ej)a. Eräässä erityisessä suoritusmuodossa keksinnön mukaisesti käytettävä uudelleenkerrostumista tai takaisinvärjäystä estävä koostumus sisältää uudelleenkerrostavaa- tai takaisinvärjäävää sellulaasia ja lisättyä proteaasia suhteessa noin 5 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 000 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 1 000 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa. Eräässä edullisemmassa suoritusmuodossa suhde on noin 10 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 200 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 200 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa. Kokonaisellulaasi- ja proteaasiproteiini voidaan mitata ereilaisilla alalla tunnetuilla määritysmenetelmillä. Tässä edullisesti käytetty määrittäminen on kaupallisesti saatava biuret-Lowry-määrittäminen, jota myy yhtiö Sigma Company, käyttäen vertailustandardina naudan seerumialbumiinia (BSA).

Uudelleenkerrostumista tai takaisinvärjäystä estävät koostumukset voivat sisältää lisäksi erilaisia ammattimiesten tuntemia apuaineita. Esimerkiksi surfaktantti (anioninen tai ioniton), joka on yhteensopiva uudelleenkerrostavan sellulaasin ja lisätyn proteaasin kanssa, olisi keksinnön mukaisesti käyttökelpois-
5 ta. Edullisia surfaktantteja ovat ionittomat, kuten polyoksietyloidut alkoholit, joita on surfaktanttien TRITON®-sarjassa (ionittomat oktyylifenoksi-
polyetoksietanolisurfaktantit), jotka ovat kaupallisesti saatavissa yhtiöstä Union Carbide. Katso esimerkiksi US-patenttijulkaisua 5 006 126 näiden yhteensopivien surfaktanttien
näytettä varten. Olisi huomattava, että surfaktantin sisällyttäminen voi lisätä kivi-
10 pesuvaikutusta edelleen yhdistelmänä uudelleenkerrostavan sellulaasin ja lisätyn proteaasin kanssa. Haluttaessa voidaan koostumuksen kanssa käyttää tai siihen sisällyttää myös muita materiaaleja, mukaan lukien kiviä, täyteaineita, liuottimia,
puskuroimisaineita, pH-arvon kontrollointiaineita, entsyymien aktivoijia, runkoaineita (builders), entsyymien stabilointiaineita, muita uudelleenkerrostumista vastusta-
15 via aineita, ja vastaavia.

Takaisinvärjäystä estävä koostumus voidaan formuloida kiinteäksi tuotteeksi, jossa kiintoaine voi olla rakeista, suihku kuivattua tai agglomeroitua. Esimerkiksi entsyymiä sisältäviksi rakeiksi, joissa kerros voi sisältää yhtä tai useaa entsyymiä, mukaan lukien sellulaaseja, proteaaseja, amylaaseja ja muita protei-
20 iineja, kuten kuvataan US-patenttihakemuksessa sarjanro 07/957 973, jätetty 7. lokakuuta 1992, joka on jatkohakemus US-patenttihakemukselle sarjanro 07/772 510, jätetty 7. lokakuuta 1991. Nämä patenttihakemukset liitetään tähän kokonaisuudessaan viitteeksi. Sellulaasilla, proteaasilla ja amylaasilla päällystetyn partikkelin yksi ajateltu käyttösovellutus on yhdistää liisterinpoisto- ja kivipesukäsittely
25 yhdessä ainoassa pesusykliissä.

Vaihtoehtoisesti takaisinvärjäystä estävät koostumukset voidaan formuloida nestegeeli- tai tahnatuotteeksi. Tässä erityisessä suoritusmuodossa uudelleenkerrostavaa sellulaasia sekoitetaan lisätyn proteaasin kanssa suhteessa noin 5 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 000 ppm
30 kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 1 000 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa. Edellä olevan seoksen stabiilin vesipohjaisen formulaation valmistamiseksi on myös lisättävä stabiloivia valmistusaineita, jotka käsittävät happea sisältäviä, vesiliukoisia orgaanisia liuottimia puskurissa pH-arvossa välillä 4 - 6. Edullisesti sorbitoli ja glyseroli ovat suositeltavia stabiloivia valmistusaineita.
35

Eräässä edullisessa suoritusmuodossa edellä olevaa nesteformulaatioseosta inkuboidaan korotetuissa lämpötiloissa alueella noin 30 - 60 °C noin 1 tunnin - 2 viikon ajan ennen denimkankaalle levittämistä. Edullisimmassa suoritusmuodossa käytetään lämpötilaa noin 37 °C ja inkubointiaikaa noin 120 tuntia.

- 5 Ammattimies ymmärtää inkubointiajan määrän riippuvan seoksen valmistukseen valitusta lämpötilasta. Edelleen ammattimies ymmärtää, että voidaan käyttää alhaisempia lämpötiloja; koostumuksessa käytetyistä sellulaaseista ja proteaaseista riippuen voidaan kuitenkin vaatia pitempiä reaktioaikoja. Edelleen otetaan huomioon, että esikäsitelty nesteformulaatio voidaan muuttaa kiinteäksi, ts. rakeiseen
- 10 muotoon, koostumuksen stabiiliuden säilyttämiseksi.

Keksinnön mukaisessa käytössä voidaan lisätyt proteaasit lisätä kivipesukylpyyn yhdessä uudelleenkerrostavan sellulaasin kanssa, tai kumpikin voidaan lisätä kivipesusellulaasikylpyyn erikseen. Vaihtoehtoisesti proteaasi voidaan lisätä erillisessä syklissä joko ennen sellulaasikylpyä tai seuraavassa huuhtelukäsittelyliuoksessa. Kaikissa edellä huomioon otetuissa menetelmissä uudelleenkerrostus vähenee noin 5 %:lla, edullisesti noin 10 %:lla, käsiteltyjen vaatteiden taustapuolen heijastuskyvyn mittauksella verrattuna kivipesuun yksistään sellulaasin kanssa. Heijastuskyvynmittausarvo kuvataan täydellisemmin tämän hakemuksen kokeellisessa osassa. Olisi kuitenkin huomattava, että heijastuskyvylle mitatut arvot puristuvat kokoon verrattuna visuaalisiin eroihin, jotka nähdään verrattaessa

15 käsiteltyä kangasta käsittelemättömään. Näköhavainto on herkempi kivipesuvaiikutuksen osoitin. Täten takaisinvärjäyksen näköhavainto vaateen taustapuolelta paljastaa käsitellyn ja käsittelemättömän kankaan välillä suuremmat erot reflektometrillä määritettyihin mittauksiin verrattuna.

25 Keksinnön eräässä suoritusmuodossa uudelleenkerrostavaa sellulaasia ja lisättyä proteaasia on läsnä suhteessa noin 5 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 000 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 1 000 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavaa sellulaasia: 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa. Eräässä edullisemmassa suoritusmuodossa suhde on noin 10 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavaa sellulaasia: 200 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 200 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa.

30

Ammattimies ymmärtää, että lisätyn proteaasin tehokas määrä vaihtelee riippuen joukosta hyvin ymmärrettyjä parametrejä, joita ovat mm. käytetyn uudelleenkerrostavan sellulaasin määrä ja puhtaus, samoin kuin ilman proteaasia

35

tapahtuvan uudelleenkerrostuksen määrä, kontaktiaika, kivipesun aikana irronneen värin määrä, uudelleenkerrostavan sellulaasin ja/tai lisätyn proteaasin spesifinen aktiivisuus, kivipesuprosessin pH-arvo ja lämpötila, tuotteen formulaatio (nestemäistä vai rakeista) ja vastaavat seikat. Alalla on hyvin tunnettua, että lisätyn proteaasin ja/tai uudelleenkerrostavan sellulaasin spesifistä aktiivisuutta voidaan modifioida käsittelemällä kantaa yhdistelmä-DNA-tekniikalla kiinnostuksen kohteena olevien komponenttien muuttamiseksi tai modifioimiseksi. Esimerkiksi määrättyjen sellulaasikomponenttien yliekspressio osoitetaan US-patenttihakemuksessa 07/770 049, joka liitetään tähän viitteeksi. Entsyymiaktiivisuuden tai -spesifisyyden modifioimiseen voidaan myös käyttää proteiininmuok-

5
10

kaustekniikoita, katso esimerkiksi US-patenttijulkaisua nro 4 760 025, joka liitetään tähän viitteeksi.

On yksinkertaista titrata lisätty proteaasi useilla pesuilla ja tarkastaa tulokseksi saadut denimkangasnäytteet visuaalisesti, jotta saataisiin tehokas määrä, joka antaa tulokseksi takaisinvärjäyksen vähenemisen. Olisi kuitenkin huomattava, että takaisinvärjäyksen vähentämiseen vaikuttavan proteolyyttisen vaikutuksen ja kulumisen vähentämiseen vaikuttavan proteolyyttisen vaikutuksen välillä on olemassa tasapaino. On löydettävä uudelleenkerrostavan sellulaasin optimisuhteen lisättyyn proteaasiin, jotta saavutettaisiin uudelleenkerrostuksen vastainen vaikutus ilman haitallisesti vaikuttavaa hankausta.

15
20

Samoin heijastuskykyarvoja voidaan käyttää uudelleenkerrostusasteen seuraamiseen vaatteiden taustapuolella, mutta se ei heijasta tarkasti vaatteiden etupuolelta hankautuneiden kuitujen välistä kontrastia. Visuaalisesti määritetyt uudelleenkerrostuksen erot ovat selvempiä kuin heijastuskykyarvojen erot, mutta heijastuskykyarvot eivät näytä vaikutusta vähäisemmässä laajuudessa.

25

Samalla kun keksinnön mukaisessa käytössä uudelleenkerrostumista tai takaisinvärjäystä estävät koostumukset, jotka on tarkoitettu denimkangaskivipesuliuoksiin lisättäviksi (joko kiinteänä aineena tai nesteinä) sisältävät uudelleenkerrostavia sellulaas(i/ej)a ja lisätty(j)ä proteaas(i/ej)a, ne voivat edelleen sisältää muita apuaineita, kuten surfaktantteja, täyteaineita, dispergoimisaineita, puskuriaineita tai pH-arvon kontrollointiaineita, entsyymiaktivaattoreita, runkoaineita, entsyymien stabilointiaineita tai muita uudelleenkerrostumisenestoainemateriaaleja. Ammattimies voi helposti verrata eri yhdisteiden ja liuosten suhteiden tuloksia sellaisten koostumusten valittujen komponenttien optimoimiseksi. Keksinnön hakijat ovat kuitenkin keksineet, että käytettyjen entsyymien tyypistä ja edellä mainittujen valittujen valmistusaineiden erityisestä seoksesta riippuen entsyymi-

30
35

valmistusaineiden suhde on edullisesti alueella noin 5 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 000 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 1 000 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa, kuten aikaisemmin määriteltiin. Eräässä edullisemmassa suoritusmuodossa suhde on noin 10 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 200 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 200 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa: 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa. Tähän suhteeseen sopivat sekä uudelleenkerrostavan sellulaasin että lisätyn proteaasin spesifisen aktiivisuuden erilaiset yhdistelmät, molempien suuresta spesifisestä aktiivisuudesta molempien alhaiseen aktiivisuuteen ja näiden välisiin variaatioihin, joissa yhdellä entsyymillä on suhteellisen suuri spesifinen aktiivisuus ja toisella suhteellisen alhainen. Lisäksi tähän suhteeseen sopivat eri puhtauden omaavien entsyymien erilaiset yhdistelmät, molempien suuresta puhtaudesta molempien alhaiseen puhtauteen ja näiden välisiin variaatioihin, joissa yksi entsyymi on suhteellisen puhtaasta ja toisella on suhteellisen alhainen puhtaus.

Kun koostumukseen sisällytetään surfaktanttia, sitä on noin 5 - 85 % joko nestemäisen tai kuivan koostumuksen kokonaispainosta. Ammattimies voi kuitenkin alentaa surfaktantin konsentraation esimerkkien pohjalta määriin alle 5 %:iin nestemäisen tai kuivan koostumuksen kokonaispainosta keksinnön suojaalasta poikkeamatta. On myös mahdollista lisätä komponentit erikseen, kaikki kerralla, tai peräkkäin (mukaan lukien erillisissä huuhtelusykleissä). Denimkankaan käsittelyyn käytetty koostumuksen määrä riippuisi kuitenkin denimsubstraatilla aktiivisten entsyymien määrästä ja niiden spesifisestä aktiivisuudesta tuolla substraatilla, halutusta kivipesuvaikutuksen määrästä ja muista ammattimiesten tuntemista parametreistä.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksinnön mukaisesti käytettävien koostumusten ja menetelmien tehokkuutta, eikä niitä ole tarkoitettu rajoittaviksi. Lisätyn proteaasin tai uudelleenkerrostavan sellulaasin, samoin kuin pesuolosuhteiden, kuten konsentraation, mittauksen, pH-arvon, lämpötilan ja vastaavien, muut valinnat ilmenevät ammattimiehelle tässä olevien opetusten pohjalta.

KOKEELLINEN OSA

Esimerkki 1

Käytetään 22,7 kg:n (50 lb.) Unimac-värijäys/pesukonetta. Koneeseen lisättiin noin 3,8 kg (10 lbs.) haluttuja testidenimvaatteita. Kone täytettiin 38 l:lla

kuumaa vettä ja lämmitettiin 55 °C:seen. Nestesuhde oli 10:1 (kg vaatetta:l nestettä). Neste puskuroitiin happamaan pH-arvoon ~4,9 käyttämällä 44 g sitruunahappomonohydraattia ja 100 g kaksiemäksistä natriumfosfaattia.

- pH-arvon vakiinnuttua lisättiin uudelleenkerrostavaa sellulaasientsyymiä INDIAGE® 44L (Trichoderma-sellulaasikoostumusta, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Genencor International, Inc.) nopeudella noin 0,5 ml tuotetta/l pesunestettä (62,5 ppm kokonaisproteiinia). Sitten lisättiin proteaasientsyymiä, GC899 (seriiniendopeptidaasia Bacillus subtiliksesta, saatavissa yhtiöstä Genencor International, Inc.) noin 2,5 ml tuotetta/l pesunestettä (163 ppm kokonaisproteiinia).
- 10 Tämä antoi tulokseksi annossuhteen noin 1:2,6 kokonaisproteiinin pohjalta. Vaatteita pestiin 60 minuutin ajan nopeudella 36 r/min. Tämän jälkeen neste laskettiin kylvystä.

- Sitten vaatteet huuhdottiin standardisoidun protokollan mukaan puhdistusnesteen kolmessa peräkkäisessä syklissä. Huuhtelu nro 1 = 91,2 l (24 gals.)
- 15 kuumaa vettä, noin 50 °C, plus ~100 g standardidetergenttiä WOB (laitoksesta American Association of Textile Chemists and Colorists [AATCC], WOB = ilman avivoimisaineita). Sekoitettiin 12 minuutin ajan nopeudella 36 r/min. Neste laskettiin kylvystä. Huuhtelu nro 2 = 91,2 l (24 gals.) lämmintä vettä, ~40 °C, ilman lisä-detergenttejä, sekoitettiin 5 minuutin ajan. Neste laskettiin kylvystä. Huuhtelu nro
- 20 3 = 91,2 l (24 gals.) kylmää vettä, ~30 °C, detergenttejä lisäämättä, sekoitettiin 5 minuutin ajan. Neste laskettiin kylvystä. Vaatteet uutettiin ja kuivattiin standardisähkövaatekuivurissa.

- Otettiin heijastuskykylukemia vaatteiden taustapuolelta Hunter Color Difference Meter -laitetta (reflektometri) käyttämällä. Heijastuskyky mitattiin heijastuskyky-prosenttina (tai valon käsittelystä kankaasta lähetyksenä), jolloin L =
- 25 100 yksikköä on valkoinen ja L = 0 yksikköä on musta. Pelkästään uudelleenkerrostavalla sellulaasilla käsittelyyn (uudelleenkerrostussellulaasikontrolli = 0,5 ml INDIAGE® 44L-tuotetta/l pesunestettä) verrattuna uudelleenkerrostavalla sellulaasilla plus lisätyllä proteaasilla käsitelty vaatteet antoivat tulokseksi merkittävästi vähentyneen takaisinvärjäyksen samanlaisilla hankaustasoilla (heijastuskykyarvot 39,07 [uudelleenkerrostussellulaasikontrolli] verrattuna 42,87:ään [uudelleenkerrostava sellulaasi ja lisätty proteaasi]). Nämä heijastuskykyarvot varmistivat visuaaliset havainnot. Lisätyllä proteaasilla käsittely antoi tulokseksi paremman
- 30 hangatun kokonaiskontrastin. Katso kuviota 1.

Esimerkki 2

Tämä testi oli oleellisen samanlainen kuin esimerkki 1 käyttäen samaa uudelleenkerrostavan sellulaasin tyyppiä ja määrää, mutta eri määrällä samaa lisättyä proteaasia. Tämä oli noin 0,5 ml tuotetta/l pesunestettä (33 ppm kokonaisproteiinia) lisättyä proteaasia. Tämä antoi annossuhteen noin 1:0,5 kokonaisproteiinin pohjalta. Kaikki muut käsittelyparametrit olivat samat.

Uudelleenkerrostussellulaasikontrolliin verrattuna heijastuskykyluke-
mat olivat kahden käsittelyn välillä merkittävän erilaiset, mutta hankaustaso ei ollut. Sellulaasikontrolli = 39,07 verrattuna sellulaasiin ja proteaasiin = 41,21. Lopullisella hangatulla ulkonäöllä oli parempi kontrasti lisätyllä proteaasilla käsitellyillä vaatteilla verrattuna käsittelemättömään (ei proteaasia) kontrolliin, lisätyllä proteaasilla käsittely esimerkissä 1 oli kuitenkin parempi kuin esimerkissä 2 osoittaen lisätyn proteaasin titrausvaikutuksen. Katso kuviota 1.

Esimerkki 3

Käsittely uudelleenkerrostavalla sellulaasilla oli sama kuin esimerkissä 1, mutta lisättyä proteaasia lisäämättä. Neste laskettiin pois kylvystä ja aloitettiin standardihuuhtelusykli esimerkissä 1 kuvatulla tavalla seuraavalla poikkeuksella: huuhtelun nro 1 alussa lisättiin 1 ml GCS99-proteaasia/l huuhtelunestettä. Käytettiin yhteensä 100 ml lisättyä proteaasituotetta (65 ppm kokonaisproteiinia). Kaikki muut olosuhteet pysyivät samoina.

Lisätyn proteaasin käyttö detergentin kanssa huuhtelusyklissä antoi tulokseksi merkittävästi vähentyneen takaisinvärjäyksen verrattuna sellulaasikontrolliin, jota huuhdottiin pelkästään detergentillä. Heijastuskykyarvo oli 40,66 lisätyn proteaasin huuhtelulla verrattuna arvoon 39,07 standardihuuhtelulla ilman lisättyä proteaasia. Hankausaste oli molemmilla käsittelyillä sama, vaikka lisätyllä proteaasilla huuhtotuilla vaatteilla nähtiin parempi kokonaiskontrasti kuin standardihuuhtelulla ilman lisättyä proteaasia. Katso kuviota 1.

Esimerkki 4

Seuraavat lisätyn proteaasin tuotteet testattiin esimerkissä 1 kuvattua sellulaasinpesuprotokollaa käyttämällä yhdessä 0,5 ml:n kanssa tuotetta/l pesunestettä uudelleenkerrostavaa sellulaasientsyymiä (62,5 ppm kokonaisproteiinia) INDIAGE® 44L (Trichoderma-sellulaasikoostumus, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Genencor International, Inc.):

1. MULTIFECT™ P64 (bakteriaalinen proteaasi, joka on peräisin Bacillus licheniformisista ja jota on saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Genencor Interna-

tional, Inc.), jota annosteltiin tasolla noin 5 g tuotetta/l pesunestettä (71 ppm kokonaisproteiinia), jolloin saatiin annossuhde noin 1:1 kokonaisproteiinin pohjalta;

2. MULTIFECT™ P53 (bakteriaalinen proteaasi, joka on peräisin Bacillus subtilisista ja jota on saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Genencor International, Inc.), jota annosteltiin tasolla noin 5 g tuotetta/l pesunestettä (88 ppm kokonaisproteiinia), jolloin saatiin annossuhde noin 1:1,5 kokonaisproteiinin pohjalta;

3. MULTIFECT™ P41 (sieniproteaasia, joka on peräisin Aspergillus oryzaesta ja jota on saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Genencor International, Inc.), jota annosteltiin tasolla noin 5 g tuotetta/l pesunestettä (172 ppm kokonaisproteiinia), jolloin saatiin annossuhde noin 1:2,75 kokonaisproteiinin pohjalta;

4. Subtilisiini GC399 (saatavissa yhtiöstä Genencor International, Inc.), jota annosteltiin tasolla noin 2,5 g tuotetta/l pesunestettä (238 ppm kokonaisproteiinia), jolloin saatiin annossuhde noin 1:4 kokonaisproteiinin pohjalta.

Kaikki lisätyn proteaasin käsittelyt antoivat tulokseksi vähemmän uudelleenkerrostusta samanlaisilla hankaustasoilla verrattuna uudelleenkerrostussellulaasikontrollivaatteisiin. Kaikissa tapauksissa lisätyn proteaasin käsittely paransi hangatun ulkänäön yleiskontrastia. Katso kuviota 2. Tämä esimerkki osoittaa vaikutuksen eri mikrobilähteistä olevilla lisätyillä proteaaseilla, joilla on sama uudelleenkerrostumisenvastainen vaikutus kuin aikaisemmissä esimerkeissä käytetyllä lisätyillä proteaasilla.

Esimerkki 5

Suoritettiin sarja sellulaasipesuja osoittamaan lisätyn proteaasiproteiinin teho sinänsä uudelleenkerrostusasteen alentamisessa vastakohtana lisätyn proteaasituotteen formulaatiokomponenteille. Käytettiin GCS99-proteaasiproteiinia, joka ei sisältänyt lainkaan muita entsyymituoteformulaatiokomponentteja kuin proteaasiproteiinia. Käytettiin samaa esimerkissä 1 kuvatua sellulaasipesumenettelytapaa.

Suoritettiin seuraavat käsittelyt:

1. Puskurikontrolli (ei proteaasia tai sellulaasia).
2. Uudelleenkerrostussellulaasikontrolli = annos 0,5 ml INDIAGE® 44L-tuotetta (Trichoderma-sellulaasikoostumus, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Genencor International, Inc.)/l pesunestettä (62,5 ppm kokonaisproteiinia).
3. Uudelleenkerrostamaton sellulaasikontrolli = annos 2,5 ml DENI-MAX™ (endoglukanaasi, joka on peräisin Humicolasta, ei-patogeenisestä homeesta, ja on saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Novo Nordisk) -tuotetta/l pesunestettä (100 ppm kokonaisproteiinia). Tämä oli valmistajan suosittelema annos. 4.

Lisätyllä proteaasilla käsittely = annos 0,5 ml INDIAGE® 44L (Trichoderma-sellulaasikoostumus, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Genencor International, Inc.) -tuotetta/l pesunestettä (62,5 ppm kokonaisproteiinia) plus noin 0,18 ml GCS99-proteaasiproteiinia/l pesunestettä (25 ppm kokonaisproteiinia). Tämä antoi tulokseksi annossuhteen noin 1:0,4 kokonaisproteiinin pohjalta.

Kaikki käsittelyt ajettiin pH-arvossa 5 paitsi uudelleenkerrostamattomalla sellulaasilla käsittely, joka suoritettiin pH-arvossa 7 valmistajan suositusten mukaan. Heijastuskyklukemat esitetään seuraavassa taulukossa 1:

Taulukko 1

10

Käsittely	Heijastuskyky (L-arvo)
Puskurikontrolli	43,25
Uudelleenkerrostussellulaasikontrolli	37,92
Uudelleenkerrostamaton sellulaasikontrolli	42,60
Lisätyllä proteaasilla käsittely	43,51

Heijastuskykytulokset vastaavat näköhavaintojen kanssa, että proteaasiproteiinin lisääminen alentaa vaatteille uudelleenkerrostumisen astetta. Proteaasilla käsitellyillä vaatteilla on samanlaiset heijastuskyklukemat kuin uudelleenkerrostamattomalla sellulaasilla käsittely. Samoin hangatun kontrastin laatu on parantunut proteaasikäsitellyllä uudelleenkerrostumissellulaasikäsitelyyn verrattuna.

Esimerkki 6

Seuraavissa käsittelyissä osoitetaan lisätyn proteaasin käyttö yhdistelmänä surfaktantin kanssa, joko lisättyinä erikseen uudelleenkerrostavan-sellulaasin kanssa tai lisättyinä uudelleenkerrostumista estävänä koostumuksena. Jälleen kaikissa tapauksissa käytettiin samaa sellulaasipesuprotokollaa, joka kuvattiin esimerkissä 1.

1. Puskurikontrolli (ilman proteaasia tai sellulaasia).
2. Uudelleenkerrostussellulaasikontrolli = annos 0,5 ml uudelleenkerrostavaa sellulaasia, CELLUSOFT™L (Trichoderma-sellulaasivalmiste, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Novo Nordisk) -tuotetta/l pesunestettä (100 ppm kokonaisproteiinia), plus annos 0,25 ml ionitonta TRITON® X-100 -surfaktanttia (ioni-

tonta oktyylifenoksipolyetoksietanolisurfaktanttia, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Union Carbide Chemicals ja Plastics Co., Inc.) tuotetta/l pesunestettä (250 ppm).

3. Lisätty proteaasi/surfaktantti-käsittely = annos 0,5 ml uudelleenkerrostavaa CELLUSOFT™L-sellulaasi (Trichoderma-sellulaasivalmistetta, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Novo Nordisk) -tuotetta/l pesunestettä (100 ppm kokonaisproteiinia), plus annos 0,25 ml ionitonta TRITON® X-100- surfaktantti (ioniton oktyylifenoksipolyetoksietanolisurfaktantti, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Union Carbide) -tuotetta/l pesunestettä (250 ppm), plus noin 0,2 ml GCS99-proteaasiproteiinia/l pesunestettä (40 ppm kokonaisproteiinia). Tämä antoi tulokseksi annossuhteen noin 1:0,4 kokonaisproteiinin pohjalta.

4. Uudelleenkerrostamaton sellulaasikontrolli = annos 2,5 ml DENI-MAX™ L -tuotetta (endoglukanaasi, joka on peräisin Humicolasta, ei-patogeenisestä homeesta ja jota on saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Novo Nordisk)/l pesunestettä (100 ppm kokonaisproteiinia).

5. Takaisinvärjäyksenestokoostumusseosta = seosta, joka koostuu uudelleenkerrostavasta Trichoderma-sellulaasista (yhtiöstä Genencor International, Inc.), subtilisiiniproteaasista (GC399 yhtiöstä Genencor International, Inc.) ja ionittomasta surfaktantista (TRITON® X-120, ioniton oktyylifenoksipolyetoksietanolisurfaktantti, saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Union Carbide) annosteltiin tasolle 2 g seosta/l pesunestettä. Tämä merkitsee suhdetta noin 1:0,4 sellulaasia/proteaasiproteiinia edellä määritellyllä tavalla. Tämä annos sekoitetuotetta antoi tulokseksi annokset 60 ppm kokonaisproteiinia sellulaasituotteesta, 24 ppm kokonaisproteiinia proteaasituotteesta, ja 120 ppm surfaktanttia. Sekoitus koostui 3 %:sta kokonaisproteiinia sellulaasista, 1,2 %:sta kokonaisproteiinia proteaasista ja 6 %:sta surfaktanttia.

Taulukko II

Käsittely	Heijastuskyky (L-arvo)
Puskurikontrolli	43,25
Uudelleenkerrostussellulaasikontrolli	35,65
Proteaasi/surfaktantti-käsittely	42,48
Uudelleenkerrostamattoman sellulaasin kontrolli	42,60
Takaisinvärjäyksen estävä koostumussekoitus	42,33

- 5 Kuten voidaan nähdä, proteaasin lisääminen uudelleenkerrostavaan sellulaasiin surfaktantin läsnä ollessa, joko erillisinä komponentteina lisättyinä kaikki yhdessä (proteaasi/surfaktantti-käsittely) tai yhtenä ainoana takaisinvärjäystä estävänä koostumuksena (takaisinvärjäyksen estävä koostumussekoitus), vähentää uudelleenkerrostuksen astetta merkittävästi. Proteaasikäsittelyjen heijastuskykyarvot ovat samanlaiset kuin uudelleenkerrostamattomalla sellulaasilla tai puskurilla käsittelyn heijastuskykyarvot. Näköhavainnot varmistavat tämän. Myös hangatun ulkonäön kontrasti on parantunut proteaasikäsittelyllä, joka on parempi kuin käsittely uudelleenkerrostussellulaasikontrollilla.

Esimerkki 7

- 15 Testi suoritettiin oleellisesti samalla tavalla kuin esimerkki 1, paitsi että proteaasi ja uudelleenkerrostava sellulaasi sekoitetaan yhteen ennen pesusykliin lisäämistä. Seos, INDIAGE 44L:ää ja Protease GCS99:ää, valmistetaan suhteessa noin 10:1 kokonaisproteiinin pohjalta. Tässä esimerkissä määrä on noin 111 ppm kokonaisproteiinia. Kun pesunesteen pH-arvo oli vakioitunut, lisättiin uudelleenkerrostavan sellulaasin ja proteaasin seosta konsentraatiossa noin 20 1,0 ml seos/l pesunestettä. Kaikki muut käsittelyparametrit olivat samat kuin esimerkissä 1, paitsi että tässä esimerkissä ja esimerkissä 8 alla käytettiin eri denimkangaserää.

- 25 Uudelleenkerrostussellulaasikontrolliin verrattuna heijastuskykyluvemat näytteellä, joka oli käsitelty uudelleenkerrostavalla sellulaasilla/proteaasilla, olivat merkittävästi erilaiset. Heijastuskykytulokset vastaavat näköhavaintoa, että

proteaasiproteiinin lisääminen seokseen alentaa denimvaatteille uudelleenkerrostumisen astetta uudelleenkerrostussellulaasikontrolliin verrattuna. Proteaasikäsitellyillä vaatteilla nähdään samanlaiset heijastuskykylukemat kuin kerrostamattomalla sellulaasilla käsittelyllä. Hangatun kontrastin laatu kankaassa oli myös parantunut uudelleenkerrostavan sellulaasin/proteaasin seoksen avulla verrattuna uudelleenkerrostavaan sellulaasiin yksinään. Katso taulukkoa III alla.

Esimerkki 8

Testi suoritettiin samalla tavalla kuin esimerkki 7 käyttäen samaa uudelleenkerrostavan sellulaasin ja proteaasin seosta, sellulaasi/proteaasisuhdetta muutettiin kuitenkin ja liitettiin mukaan lisäkuumennusprosessi.

Valmistettiin seos, joka sisälsi INDIAGE 44L:ää ja Protease GCS99:ää suhteessa noin 60:1 kokonaisproteiinin pohjalta. Seosta kuumennettiin edelleen lämpötilaan 37 °C 120 tunnin ajan ennen pesusykliin lisäämistä. Tässä esimerkissä määrä on noin 122 ppm kokonaisproteiinia. Kaikki muut käsittelyparametrit olivat samat kuin esimerkeissä 1 ja 7 kuvatut.

Taulukko III

Käsittely	Heijastuskyky (L-arvo)
Uudelleenkerrostussellulaasikontrolli	45,08
Uudelleenkerrostussellulaasi/proteaasiseos (esimerkki 7)	52,58
Uudelleenkerrostussellulaasi/proteaasiseos Lämpökäsittely (esimerkki 8)	52,53
Uudelleenkerrostamaton sellulaasikontrolli	51,86

Samalla tavalla kuin tuloksissa esimerkistä 7, jossa vaatteet käsitelään uudelleenkerrostavan sellulaasi/proteaasin seoksella, johtaa vaatteiden käsittely aikaisemmin lämmitetyllä uudelleenkerrostavan sellulaasin/proteaasin seoksella parantuneeseen takaisinvärjäyksen vähenemiseen verrattuna vaatteisiin, jotka on käsitelty pelkästään uudelleenkerrostavalla sellulaasilla. Lisäksi hangatun ulkonäön kontrasti on selvästi parantunut käytettäessä etukäteen inku-

boitua sellulaasi/proteaasiseosta verrattuna uudelleenkerrostussellulaasikontrolliin ja esimerkin 7 uudelleenkerrostavan sellulaasin/proteaasin seokseen.

0
0
0
0
0
0

0
0
0
0
0
0
0
0
0
0

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä paikallisesti rajoittuvien alueiden lisäämiseksi indigovärijätyn denimkankaan pinnalle, joilla paikallisesti rajoittuvilla alueilla on väritiheyden vaihtelua ja suuri kontrasti denimkankaan sinisten ja valkoisten kuitujen välillä, t u n n e t t u siitä, että denimkangas saatetaan kontaktiin:

a. tehokkaan määrän kanssa uudelleenkerrostavaa sellulaasia, joka on riittävä väritiheyden vaihteluiden tuottamiseen; ja

b. tehokkaan määrän kanssa lisättyä proteaasia, joka on riittävä taikaisinvärjäyksen vähentämiseen ja sinisten ja valkoisten kuitujen välisen kontrastin

lisäämiseen missä hyvänsä järjestyksessä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sellulaasin ja proteaasin tehokas määrä on suhde noin 5 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa : 1 000 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 1 000 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa : 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisätty proteaasi on seriini- tai metalloproteaasia.

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteaasi on Bacilluksesta tai Aspergilluksesta.

5. Minkä tahansa edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että edelleen lisätään riittävä määrä surfaktanttia uudelleenkerrostuneen indigovärin poiston edelleen lisäämiseksi.

6. Minkä tahansa edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että uudelleenkerrostava sellulaasi on Trichodermasta.

7. Minkä tahansa edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisättyä proteaasia tai uudelleenkerrostavaa sellulaasia on modifioitu yhdistelmä-DNA-tekniikalla sellaisen kannan tuottamiseksi, joka yliekspressoii proteaasin tai sellulaasin erityisiä komponentteja tai jossa on deleetio erityisten komponenttien suhteen.

8. Minkä tahansa edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisättyä proteaasia tai uudelleenkerrostavaa sellulaasia on modifioitu proteiininmuokkauksella sellaisten proteaasi- tai sellulaasientsyymien tuottamiseksi, joilla on muuttuneet ominaisuudet, kuten entsyymiaktiivisuus tai -spesifisyys.

9. Minkä tahansa edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että denimkangas saatetaan edelleen kontaktiin hohkaki-
vien kanssa.

10. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
5 että seriiniproteaasi on subtilisiinia.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että uudelleenkerrostava sellulaasi ja proteaasi sekoitetaan yhteen ennen kosketusta denimin kanssa ja seosta pidetään lämpötila-alueella noin 30 - 60 °C noin 1 tunnin - noin 14 päivän ajan.

10 12. Proteaasin ja uudelleenkerrostavan sellulaasin käyttö takaisinvärjäyksen estämiseen käytettäessä sellulaasia paikallisesti rajoittuvien väritiheydeltään vaihtelevien alueiden lisäämiseksi indigovärjätyin denimkankaan pinnalle, jolloin denimkankaan sinisten ja valkoisten kuitujen välille syntyy suuri kontrasti.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että
15 uudelleenkerrostavaa sellulaasia ja lisättyä proteaasia käytetään suhteessa noin 5 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa : 1 000 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa - 1 000 ppm kokonaisproteiinia uudelleenkerrostavassa sellulaasissa : 1 ppm kokonaisproteiinia lisätyssä proteaasissa.

14. Patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä,
20 että proteaasi on seriini- tai metalloproteaasia.

15. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 12 - 14 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että proteaasi on Bacilluksesta tai Aspergilluksesta.

16. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 12 - 15 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että denimkangas saatetaan lisäksi kosketuksiin riittävän
25 määrän kanssa surfaktanttia uudelleenkerrostuneen indigovärin poiston edelleen lisäämiseksi.

17. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 12 - 16 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että uudelleenkerrostava sellulaasi on Trichodermasta.

18. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 12 - 17 mukainen käyttö,
30 t u n n e t t u siitä, että proteaasia tai uudelleenkerrostavaa sellulaasia on modifioitu yhdistelmä-DNA-tekniikalla sellaisen kannan tuottamiseksi, joka yliekspresoi proteaasin tai sellulaasin erityisiä komponentteja tai jossa on deletio erityisten komponenttien suhteen.

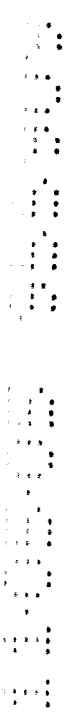
19. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 12 - 18 mukainen käyttö,
35 t u n n e t t u siitä, että proteaasia tai uudelleenkerrostavaa sellulaasia on modifioitu proteiininmuokkauksella sellaisten proteaasi- tai sellulaasientsyymien tuot-

tamiseksi, joilla on muuttuneet ominaisuudet, kuten entsyymiaktiivisuus tai -spesifisyys.

20. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 12 - 19 mukainen käyttö, tunnettu siitä, että denimkangas saatetaan edelleen kontaktiin hohkakivien
5 kanssa.

21. Patenttivaatimuksen 14 mukainen käyttö, tunnettu siitä, että seriiniproteaasi on subtilisiiniä.

22. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 12 - 21 mukainen käyttö, tunnettu siitä, että uudelleenkerrostava sellulaasi ja proteaasi sekoitetaan
10 yhteen ennen kosketusta denimin kanssa ja seosta pidetään lämpötila-alueella noin 30 - 60 °C noin 1 tunnin - noin 14 päivän ajan.



Patentkrav

1. Förfarande för att förse ytan hos indigofargat denimtyg med lokaliserade områden med variation i färgdensitet och en hög kontrast mellan blå och vita fibrer i denimtyget, k ä n n e t e c k n a t a v a t t nämnda förfarande
- 5 innefattar behandling av denimtyget med:
- a. en effektiv mängd av ett återdeponerande cellulaset vilken är tillräcklig för att producera variationerna i färgdensiteten; och
 - b. en effektiv mängd av ett tillsatt proteas vilken är tillräckligt för att reducera återfärgning och öka kontrasten mellan blå och vita fibrer
- 10 i vilken ordning som helst.
2. Förfarande enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a t a v a t t den effektiva mängden av cellulaset och proteas är ett förhållande från omkring 5 ppm totalprotein i återdeponerande cellulaset : 1000 ppm totalprotein i tillsatt proteas till 1000 ppm totalprotein i återdeponerande cellulaset : 1 ppm totalprotein i tillsatt proteas.
- 15
3. Förfarande enligt krav 1 eller krav 2 k ä n n e t e c k n a t a v a t t det tillsatta proteaset är ett serin- eller metalloproteas.
4. Förfarande enligt något av krav 1 till 3 k ä n n e t e c k n a t a v a t t proteaset är från *Bacillus* eller *Aspergillus*.
- 20
5. Förfarande enligt något av de föregående kraven, k ä n n e t e c k n a t a v a t t ett ytaktivt medel vidare tillsätts i en mängd vilken är tillräcklig för att ytterligare öka borttagandet av återdeponerande indigofärg.
6. Förfarande enligt något av de föregående kraven k ä n n e t e c k n a t a v a t t det återdeponerande cellulaset är från *Trichoderma*.
- 25
7. Förfarande enligt något av de föregående kraven k ä n n e t e c k n a t a v a t t det tillsatta proteaset eller det återdeponerande cellulaset har modifierats genom rekombinant DNA-teknik för att ge en stam vilken överuttrycker särskilda komponenter av proteaset eller cellulaset eller vilken har specifika komponenter deleterade.
- 30
8. Förfarande enligt något av de föregående kraven, k ä n n e t e c k n a t a v a t t det tillsatta proteaset eller det återdeponerande cellulaset har modifierats genom proteinmodifiering för att ge proteas- eller cellulaset enzymer vilka har förändrade egenskaper, såsom enzymaktivitet eller specificitet.
- 35
9. Förfarande enligt något av de föregående kraven, k ä n n e t e c k n a t a v a t t denimtyget vidare behandlas med pimpstenar.

10. Förfarande enligt krav 3, kännetecknat av att det serinproteaset är ett subtilisin.

11. Förfarande enligt krav 1, kännetecknat av att det återdeponerande cellulaset och proteaset blandas tillsammans före behandlingen av denimtyget och blandningen hålls vid en temperatur som varierar från omkring 30°C till omkring 60°C i omkring 1 timme till omkring 14 dagar.

12. Användning av ett proteas och ett återdeponerande cellulaset för att reducera återfärgning när cellulaset används för att introducera lokaliserade områden av variation i färgdensitet till ytan av indigofärgat denimtyg, vilket därigenom åstadkommer en hög kontrast mellan blå och vita fibrer i denimtyget.

13. Användning enligt krav 12, kännetecknad av att det återdeponerande cellulaset och det tillsatta proteaset används i ett förhållande från omkring 5 ppm totalprotein i återdeponerande cellulaset : 1000 ppm totalprotein i tillsatt proteas till 1000 ppm totalprotein i återdeponerande cellulaset : 1 ppm totalprotein i tillsatt proteas.

14. Användning enligt krav 12 eller krav 13, kännetecknad av att proteaset är ett serin- eller metalloproteas.

15. Användning enligt något av krav 12 till 14, kännetecknad av att proteaset är från *Bacillus* eller *Aspergillus*.

16. Användning enligt något av krav 12 till 15, kännetecknad av att denimtyget vidare behandlas med ett ytaktivt medel i en tillräcklig mängd för att ytterligare öka borttagandet av återdeponerande indigofärg.

17. Användning enligt något av krav 12 till 16, kännetecknad av att det återdeponerande cellulaset är från *Trichoderma*.

18. Användning enligt något av krav 12 till 17, kännetecknat av att proteaset eller det återdeponerande cellulaset har modifierats genom rekombinant DNA-teknik för att ge en stam vilken överuttrycker särskilda komponenter av proteaset eller cellulaset eller vilken har specifika komponenter deleterade.

19. Användning enligt något av krav 12 till 18, kännetecknad av att proteaset eller det återdeponerande cellulaset har modifierats genom proteinmodifiering för att ge proteas- eller cellulasezymer vilka har förändrade egenskaper, såsom enzymaktivitet eller specificitet.

20. Användning enligt något av krav 12 till 19, kännetecknad av att denimtyget vidare behandlas med pimpstenar.

21. Användning enligt krav 14, kännetecknad av att serinproteaset är ett subtilisin.

22. Användning enligt något av krav 12 till 21 kännetecknad av att det återdeponerande cellulaset och proteaset blandas tillsammans
- 5 före behandling av denimtyget och blandningen bibehålls vid en temperatur vilken sträcker sig från omkring 30⁰C till omkring 60⁰C i omkring 1 timme till omkring 14 dagar.

FIG. 1

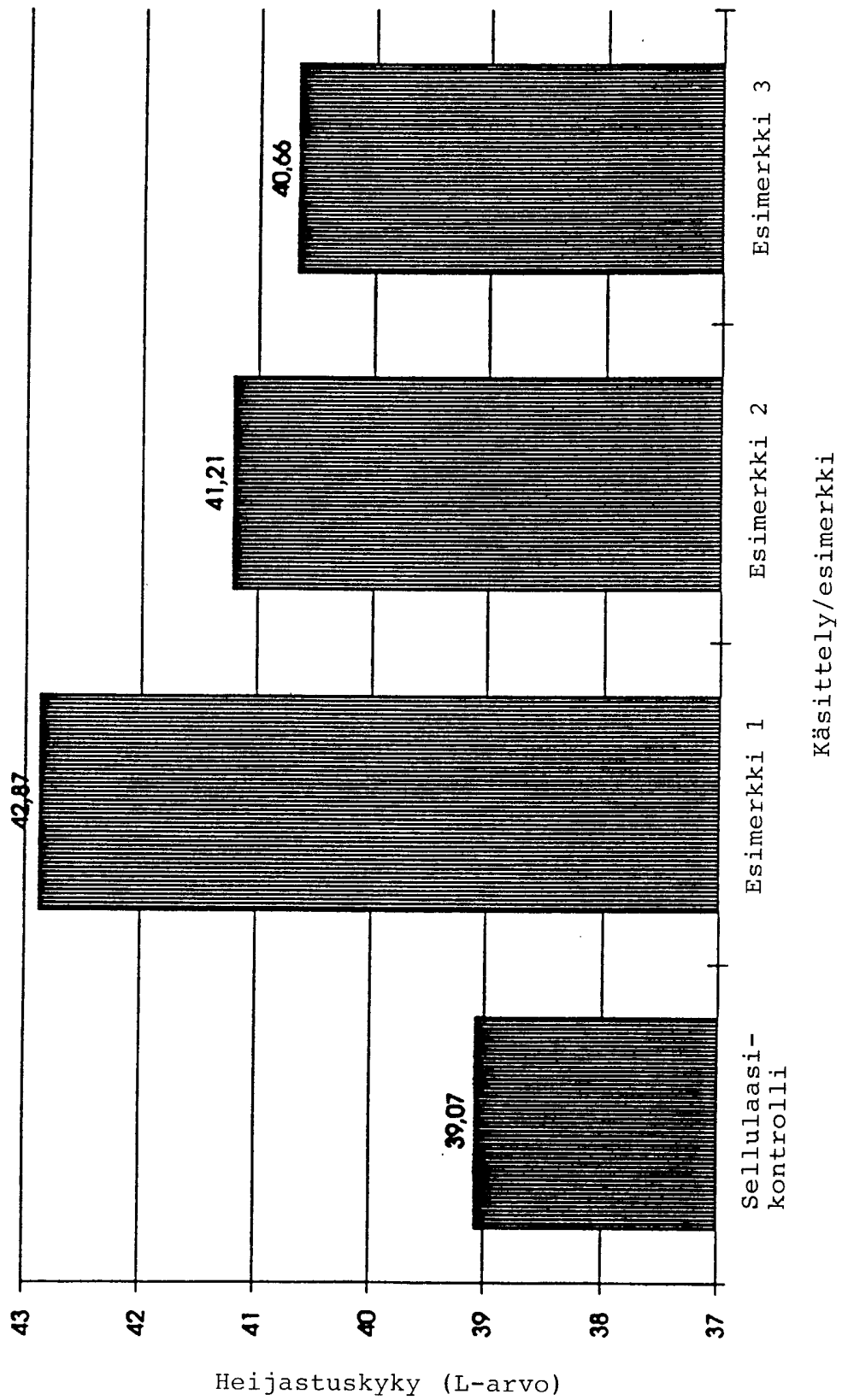


FIG. 2

