FI000106803B

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 106803 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **12.04.2001**

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7
C12N 9/08

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **934240**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **27.09.1993**

(24) Alkupäivä - Löpdag **27.03.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **27.09.1993**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/DK92/00098**

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

27.03.1991 EP 91610024 P 04.06.1991 EP 91610050 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

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

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Christensen,Bjoern Eggert, Dronninggårds Allé, 2840 Holte, TANSKA, (DK)
2 •Lange,Niels Krebs, Soendergårdsvej 39, 2860 Soeborg, TANSKA, (DK)
3 •Daimon,Kousaku, II-205 Kopo Ebihara 2-9-9 Higashi Funabashi, Funabashi-shi 273, Chiba, JAPANI, (JP)

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

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Katalaasi, sen valmistus ja käyttö
En katalas, dess produktion och användning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

GB A 2216149 (D06L 3/14),
WPI An: 1990-128241 (17), JP A 2076578, tiivistelmä

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Uusi katalaasi saadaan sukujen Scytalidium ja Humicola-lajeista, jotka ovat kaksi sukua, joiden ei ole aikaisemmin ilmoitettu tuottavan katalaasia. Tällä uudella katalaasilla on parempi stabiilisuus korkealla pH-arvolla ja korkeassa lämpötilassa kuin tunnetuilla katalaaseilla.

En ny katalas erhålls från arter av Scytalidium och Humicola, två släkter som inte tidigare har raporterats producera katalas. Denna nya katalas har bättre stabilitet vid hög pH och tempereatur än kända katalaser.

Katalaasi, sen valmistus ja käyttö - En katalas, dess produktion och användning

Tämä keksintö koskee uutta katalaasia, menetelmää sen valmistamiseksi ja sen käyttöä vetyperoksidin poistossa.

Katalaasi (EC 1.11.1.6) on entsyymi, joka katalysoi vetyperoksidin hajoamista vedeksi ja molekulaariseksi hapeksi. Sitä voidan käyttää jäännösvetyperoksidin poistamiseen sovellutuksissa, joissa vetyperoksidia lisätään esim. pastörointia tai valkaisua varten.

Näin ollen on ehdotettu käytettäväksi katalaasia tekstiiliteollisuudessa vetyperoksidin poistoon kankaasta, joka valkaistaan alkaalisella vetyperoksidikäsittelyllä ennen värjäystä (GB 2 216 149, JP-A-2-104 781). Peroksidivalkaisu suoritetaan yleensä korkealla pH-arvolla ja korkeassa lämpötilassa, esim. 80-100 °C:ssa ja pH-arvolla 10 tai yli sen ja tämän vuoksi on toivottavaa käyttää katalaasia, jolla on hyvä stabiilisuus korkealla pH-arvolla ja korkeassa lämpötilassa, jotta vältettäisiin tai minimoitaisiin neutraloinnin ja jäähdytyksen tarve.

Tunnetaan katalaaseja, jotka ovat peräisin sekä eläinlähteistä (esim. lehmän maksasta) että monista eri mikro-organismeista. Patentissa JP-A-2-76579 paljastetaan katalaasi, joka on saatu Aspergillus niger kannasta NFAG-2 pH-arvolla 3-8. Patentissa GB 2 216 149 esitetään, että Penicillium-suvusta saadulla katalaasilla on hyvä stabiilisuus korkealla pH-arvolla.

Tämän keksinnön tavoitteena on saada aikaan parannettu katalaasi käytettäväksi tällaisissa menetelmissä.

Nyt on odottamatta havaittu, että uusi katalaasi voidaan saada Scytalidium ja Humicola kannoista, joiden sukujen ei ole aikaisemmin ilmoitettu tuottavan katalaasia ja edelleen on havaittu, että yllättäen tällä uudella katalaasilla on parempi stabiilisuus korkealla pH-arvolla ja korkeassa lämpötilassa kuin tunnetuilla katalaaseilla.

Näin ollen tämä keksintö kohdistuu katalaasiin, jolle on tunnusomaista, että sen optimi-pH on noin 6-8 ja se on peräisin mistä tahansa kannasta Scytalidium thermophilum ATCC 28085, ATCC 48409 tai CBS 672.88 tai H. insolens UAMH 2025, IMI 158747 tai ATCC 39627. Toisessa kohdassaan tämä keksintö kohdistuu katalaasivalmisteeseen, jolle on tunnusomaista, että se on peräisin Scytalidium tai Humicola

kannasta ja sillä on vähintään 75 %:n jäännösaktiivisuus 20 minuutin kuluttua 70 °C:ssa pH-arvolla 9-10,5, kun läsnä on 40 ppm polyvinyylipyrrolidonia.

Tämä keksintö kohdistuu edelleen menetelmään katalaasin valmistamiseksi, jolle on tunnusomaista, että viljellään suvun Humicola tai suvun Scytalidium katalaasia tuottavaa kantaa. Lopuksi tämä keksintö kohdistuu mainitun katalaasin käyttöön vetyperoksidin poistossa.

Mikro-organismi

Humicola-Scytalidium-kompleksia on kuvannut D.H. Ellis, Trans. Br. Mycol. Soc. 78 (1), 129-139 (1982). Kaikki tähän kompleksiin kuuluvat eristetyt organismit voidaan sijoittaa kahteen selvästi erottuvaan lajiin: Humicola insolens (Cooney & Emerson) ja Scytalidium thermophilum (Cooney & Emerson) Austwick.

Scytalidium-suvun määrittämistä ja luokittelua ovat kuvanneet Pesante, 1957, Annali Sper. Agr. N.S., 11, Suppl.: CCLXI-CCLXV ja M.B. Ellis (1971), Dematiaceous Hyphomycetes, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Englanti, sivu 28.

Esimerkkejä S. thermophilum-suvun katalaasia tuottavista kannoista ovat kannat ATCC 28085, ATCC 48409 ja CBS 671.88 ja H. insolens kannoista ovat kannat UAMH 2025, IMI 158747 ja ATCC 34627, joita on julkisesti saatavissa kokoelmasta American Type Culture Collection, Centralbureau voor Schimmelculturen, University of Alberta Microfungus Collection ja laitokselta Herbaria and CAB International Mycological Institute, samassa järjestyksessä.

Humicola-Scytalidium-kopleksi sisältää termofiilisia hyfomyseetteja, jotka on aikaisemmin luokiteltu seuraavasti Humicola grisea var. thermoidea, Cooney & Emerson, H. insolens, Cooney & Emerson ja Torula thermophila, Cooney & Emerson, joita on kuvattu teoksessa Cooney, D.G. & Emerson, R.: Thermophilic Fungi. An account of their biology, activities and classification, San Fransisco: Freeman (1964).

Kanta ATCC 28805 luokiteltiin aikaisemmin Torula thermophila. Austwick, P.C.K., New Zealand Journal of Agricultural research, 19, 25 -33 (1976) on nyt luokitellut Torula thermophilan Scytalidium thermophilumiksi.

Katalaasin valmistus

Tämän keksinnön katalaasia voidaan valmistaa viljelemällä aerobisesti edellä mainittua mikrobiakntaa ravintoväliaineessa, joka sisältää sopivia hiili- ja typpilähteitä,

jotka väliaineet ovat alalla tunnettuja. Lämpötila välillä 40-60 °C on sopiva kasvatukselle ja katalaasin tuotannolle.

Vaihtoehtoisesti tämän keksinnön katalaasia voidaan valmistaa viljelemällä aerobisesti siirrettyä isäntäorganismia, joka sisältää asianmukaisen geneettisen informaation edellä mainituista kannoista. Tällaisia siirrännäisiä voidaan valmistaa ja viljellä alalla tunnetuin menetelmin.

Katalaasi voidaan ottaa talteen poistamalla solut käymisväliaineesta (esim. suodattamalla) ja väkevöimällä sitten viljelyliemi (esim. ultrasuodatuksella). Haluttaessa katalaasia voidaan puhdistaa edelleen tunnetuin menetelmin.

Katalaasivalmiste

Proteaasivapaa katalaasivalmiste on yleensä etusijalla paremman stabiilisuuden saavuttamiseksi. Eräät tässä keksinnössä käytetyt kannat voivat tuottaa proteaasia, mutta proteaasivapaa katalaasia tuottava kanta voidaan saada mutaatiolla tai siirtämällä geeniä koodaava katalaasi proteaasivapaaseen siirrännäiseen tunnetuin menetelmin.

Katalaasivalmiste voi olla kiinteässä tai nestemäisessä muodossa. Varastostabiili nestemäinen valmiste voidaan valmistaa käyttäen tunnettua stabilisaattoria, esim. propyleenglykolia lähellä neutraalia pH-arvoa.

Immunokemialliset ominaisuudet

Katalaasivalmisteet, joiden immunokemialliset ominaisuudet ovat identtiset tai osittain identtiset sen katalaasin kanssa, joka on peräisin S. thermophilum kannasta ATCC 28085, ja joilla on edellä mainittu lämpöstabiilisuus, ovat myös tämän keksinnön suojapiirin puitteissa. Immunokemialliset ominaisuudet voidaan määrittää immunologisin ristireaktiotunnistuskokein. Tunnistuskokeet voidaan suorittaa hyvin tunnetulla Ouchterlongy-kaksoisimmunodiffuusiomenettelyllä tai perättäisellä ristikkäisimmunoelektroforeesilla N.H. Axelsenin mukaan; Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques; Blackwell Scientific Publications (1983) luvut 5 ja 14. Termit "antigeeninen identtisyys" ja "osittainen antigeeninen identtisyys" esitetään samassa kirjassa luvuissa 5, 19 ja 20.

Antigeenisen identtisyyden selvittämiseksi suoritettiin Ouchterlony-kaksoisimmunodiffuusiomenettely käyttäen kaniinin antiseerumia, joka oli kohotettu puhdistettua Scytalidium thermophilum-katalaasia vastaan, ja yläpuolisia nesteitä kantojen S. thermophilum ATCC 48409 ja CBS 671.88 samoin kuin kantojen H. insolens

UAMH 2025, IMI 158747 ja ATCC 34627 viljelmistä ja Catazyme ™-näytteestä, joka on Aspergillus niger kannasta peräisin oleva katalaasivalmiste.

Saadut kuviot osoittivat Scytalidium ja Humicola kantojen tuottamien katalaasien täydellistä identtisyyttä, eikä mitään yhtäläisyyttä Scytalidium-katalaasin ja A. niger-katalaasin välillä, kuten Axelsenin kirjan luvussa 5 esitetään.

Lämpöstabiilisuus

Tämän keksinnön katalaasin lämpöstabiilisuus on parempi kuin aikaisemman tekniikan entsyymeillä ja se on lähes riippumaton pH-arvosta ainakin pH-arvoon 10,5 asti. Tämän keksinnön katalaasi kykenee kestämään 10 °C korkeampia lämpötiloja (vähintään 70 °C) kuin aikaisemman tekniikan, A. nigerstä saatu katalaasi, jota korkea pH edelleen destabiloi.

Seuraavassa taulukossa verrataan näiden kahden entsyymin lämpöstabiilisuutta. Kumpaakin entsyymiä haudottiin ilmoitetussa lämpötilassa ja pH-arvossa ja ilmoitettu aika 0,05-M fosfaattipuskurissa tai 0,18 %:sessa natriumsilikaatissa + 0,05 %:sessa Na_2CO_3:sa (viimemainittu merkitty x):llä) ja jäljelle jäänyt aktiivisuus mitattiin CIU-yksiköissä (kuvataan jäljempänä). 40 ppm polyvinyylipyrrolidonia oli läsnä kaikissa tapauksissa. H_2O_2:a ei ollut läsnä.

60 °C	**Tämä keksintö**				**Aikaisempi tekniikka**			
pH	**9**	**10**	**10***	**10,5**	**9**	**10**	**10***	**10,5**
0 min	359	383	375	411	401	269	454	303
20 min	420	411	371	411	319	308	308	250
40 min	401	392	348	401	288	288	233	246
60 min	411	401	329	411	245	240	173	209

70 °C	**Tämä keksintö**			**Aikaisempi tekniikka**		
pH	**9**	**10**	**10,5**	**9**	**10**	**10,5**
0 min	442	431	431	240	332	493
20 min	371	371	371	70	77	82
40 min	329	303	303	-	-	-
60 min	267	278	248	-	-	-

Näin ollen tämän keksinnön katalaasi säilytetään pH-alueella 9-10,5 vähintään 90 % aktiivisuudestaan 60 minuutin kuluttua 60 °C:ssa ja 75 % 70 °C:ssa 20 minuutin kuluttua, vähintään 60 % 40 minuutin kuluttua ja vähintään 50 % 60 minuutin kuluttua.

Varastostabiilisuus

Tämän keksinnön katalaasin vesiliuos ei osoittanut havaittavaa aktiivisuuden menetystä 4 viikon säilytyksen jälkeen 37 °C:ssa pH-arvolla 5,5-7,0. Samanlainen koe aikaisemman tekniikan katalaasilla, joka oli saatu A. niger-lajista, osoitti alle 90 %:n jäännösaktiivisuutta.

Entsyymin kemialliset ominaisuudet

Kuvio 1 esittää aktiivisuutta pH-arvon funktiona tämän keksinnön katalaasilla (esimerkin 2 viljelysuodos) verrattuna A. niger-lajista saatuun aikaisemman tekniikan katalaasiin (valmistettu patentin JP-A 2-76579 mukaisesti). Tämän keksinnön katalaasin aktiivisuusoptimi on pH-arvolla noin 7 (5,5 aikaisemman tekniikan entsyymillä) ja sillä on melko laakea pH/aktiivisuuskäyrä, jossa yli 90 % maksimiaktiivisuudesta säilyy pH-alueella 4-9.

Seuraavat ominaisuudet määritettiin käyttäen esimerkin 5 puhdistettua entsyymiä.

Moolimassa MW = noin 92 000 (Pharamaphast SDS)
Isoelektrinen piste pl = noin 4,5 (Pharamaphast IEF)

Puhtaan entsyymiproteiinin spesifinen katalaasiaktiivisuus = noin 16 300 CIU/mg proteiinia (CIU kts. jäljempänä, proteiini mitattu Biuret-menetelmällä).

Vetoperoksidin poisto

Tämän keksinnön katalaasia voidaan käyttää jäännösvetyperoksidin poistoon kaikissa sovellutuksissa, joissa vetyperoksidia lisätään pastörointia, valkaisua, hajun vähentämistä tai muita tarkoituksia varten. Esimerkkejä tällaisista käytöistä on tekstiilin prosesoinnissa, kontaktilinssien puhdistuksessa ja sillinmädin käsittelyssä (kuten on kuvattu patentissa JP-A 2-76 579).

Tekstiiliteollisuudessa katalaasia voidaan käyttää takaamaan tasainen värjäys poistamalla jäännösperoksidi sen käytön jälkeen valkaisuaineena. Prosessia on kuvattu patenteissa GB 2 216 149 ja JP-A 2-104 781. Tyypillisesti katalaasikäsittely tapahtuu 10-30 minuutissa 60-100 °C:ssa, pH-arvolla 9-11, erityisesti 60-70 °C:ssa pH-arvolla 9-10,5 10-60 minuutissa. Tyypillisesti vetyperoksidipitoisuus alussa on 200-2000 ppm ja katalaasiannos 3 000-30 000 CIU/l (yksikkö määritellään jäljempänä).

Kontaktilinssien päivittäisessä puhdistuksessa ne voidaan desinfioida vetyperoksidilla ja käsitellä sitten katalaasilla fysiologisessa suolaliuoksessa lähellä neutraalia pH-arvoa. Hyvä varastostabiilisuus tekee tämän keksinnön katalaasista hyvin sopivan tähän tarkoitukseen.

Katalaasin määrittäminen

Yksi katalaasiyksikkö CIU hajottaa yhden µ-moolin H_2O_2:a minuutissa pH-arvolla 7,0 25 °C:ssa samalla, kun H_2O_2-pitoisuus laskee 10,3 µ-moolista 9,2 µ-mooliin yhtä millilitraa kohti reaktioseosta. Vetyperoksidin hajoamista seurataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 240 nm.

Esimerkki 1

S. thermophilum kannan viljely

100 ml väliainetta, joka sisälsi 30 g/l dekstriiniä, 50 g/l farmaseuttisia väliaineita, 0,2 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 8 g/l $Na_2HPO_4.12H_2O$, 3 g/l KH_2PO_4, 0,1 ml/l Pluronic-valistetta, asetettiin 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, jossa oli 2 väliseinää. pH säädettiin arvoon 7,0 ennen sterilointia (autoklaavissa), jota suoritettiin 120 °C:ssa 20 minuutin ajan. Steriloituun väliaineeseen istutettiin pieniä palasia Bacto Potato Dextrose Agar-valmistetta (Difco), joka sisälsi Scytalidium thermophilum kannan ATCC 28085 itiöitä tuottavaa kasvustoa. Tämän viljelmän annettiin kasvaa 40 °C:ssa korkeintaan 6 vuorokautta nopeudella 250 rpm pyörivällä ravistimella.

Esimerkki 2

S. thermophilum kannan viljely

Scytalidium thermophilum kantaa ATCC 28085 viljeltiin 4-6 vuorokautta kuten esimerkissä 1 ja 5 ml tätä viljelmää istutettiin 100 ml:aan esimerkissä 1 esitettyä väliainetta ja tätä uutta viljelmää kasvatettiin 75 tuntia samanlaisissa olosuhteissa kuin esimerkissä 1. 75 tunnin kuluttua pH oli 8,6. Tämän viljelmän suodoksen katalaasitiitteri oli 10 700 CIU/ml.

Esimerkki 3

H. insolens kannan viljely

100 ml:aan esimerkissä 1 käytettyä väliainetta istutettiin pieniä palasia Bacto Potato Dextrose Agar-valmistetta (Difco), joka sisälsi Humicola insolens kannan IMI 158 747 runsasta kasvustoa. Tämän viljelmän annettiin kasvaa 30 °C:ssa korkeintaan 3 vuorokautta pyörivällä ravistimella nopeudella 250 rpm. 5 ml tätä viljelmää istutettiin 100 ml:aan esimerkissä 1 esitettyä väliainetta ja tätä uutta viljelmää kasvatettiin 165 tuntia 30 °C:ssa pyörivällä ravistimella nopeudella 250 rpm. 165 tunnin kuluttua pH oli 8,5. Tämän viljelmän suodoksen katalaasitiitteri oli 3820 CIU/ml.

Esimerkki 4

Vetyperoksidin poisto korkeassa lämpötilassa ja pH-arvossa

Tämän keksinnön katalaasia verrattiin kahteen aikaisemman tekniikan entsyymiin vetyperoksidin poistossa 60 °C:ssa pH-arvolla 10.

Esimerkin 2 viljelysuodos testattiin yhdessä A. niger kannasta saadun katalaasin kanssa, joka oli valmistettu patentin JP-A 2-76 579 mukaisesti, ja kaupallisen katalaasivalmisteen Ask™ 25 kanssa (yhtiön Mitsubishi Gas Chemical tuote).

Reaktio-ososuhteet olivat 60 °C, pH 10 (0,4 g $NaHCO_3$ + 0,6 g Na_2CO_3 litrassa), 25-1500 ppm H_2O_2 (kuten jäljempänä ilmoitetaan) ja entsyymipitoisuus 2000-30 000 CIU/l (kuten jäljempänä ilmoitetaan).

Jäännös-H_2O_2 todettiin Merck Peroxide-koepaperilla. Tämä tehtiin 10, 15 ja 20 minuutin kuluttua entsyymin lisäyksestä H_2O_2-liuokseen.

Tulokset esitetään seuraavissa taulukoissa, joissa käytetään seuraavia symboleja:

*	H_2O_2 hävisi 10 minuutissa	
0	- " -	- " - 15 "
x	- " -	- " - 20 "
-	H_2O_2 ei hävinnyt 20 minuutissa	
A	Katalaasiannos (CIU/l)	
B	H_2O_2 (ppm)	

Tämän keksinnön katalaasi

	A									
B	30000	22500	20000	15000	10000	7500	6000	3750	3000	2000
1500	*	*	0	0	-	-	-	-	-	-
1000	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
750	*	*	*	*	0	-	-	-	-	-
500	*	*	*	*	*	x	-	-	-	-
250	*	*	*	*	*	*	0	x	-	-
100	*	*	*	*	*	*	*	0	-	-
75	*	*	*	*	*	*	*	0	-	-
50	*	*	*	*	*	*	*	0	x	-
25	*	*	*	*	*	*	*	*	0	-

A. niger kannasta saatu katalaasi (vertailu)

	A									
B	30000	22500	20000	15000	10000	7500	6000	3750	3000	2000
1500	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	*	*	0	-	-	-	-	-	-	-
750	*	*	*	x	-	-	-	-	-	-
500	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
250	*	*	*	*	x	x	-	-	-	-
100	*	*	*	*	x	x	-	-	-	-
75	*	*	*	*	*	x	-	-	-	-
50	*	*	*	*	*	0	-	-	-	-
25	*	*	*	*	*	*	0	-	-	-

Ask 25 (vertailu)

	A									
B	30000	22500	20000	15000	10000	7500	6000	3750	3000	2000
1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tulokset osoittavat selvästi, että tämän keksinnön katalaasi on ylivoimainen aikaisemman tekniikan entsyymeihin verrattuna H_2O_2:n poistossa korkeassa lämpötilassa ja pH-arvossa. Niinpä 6000 CIU/l tämän keksinnön katalaasia kykenisi poistamaan 25-100 ppm vetyperoksidia 10 minuutissa.

Esimerkki 5

H_2O_2:n poisto 60 °C:ssa

Koe suoritettiin 60 °C:ssa 0,05-M fosfaattipuskurissa pH-arvolla 9 tai 10 (kuten seuraavassa ilmoitetaan), joka sisälsi 1000 ppm H_2O_2. Lisättiin 10 CIU/ml tämän keksinnön katalaasia (esimerkin 2 viljelysuodos) ja H_2O_2:n määrä mitattiin 20, 40 ja 60 minuutin kuluttua. Tulokset (ppm H_2O_2):

	pH 9	pH 10
20 min	8	11
40 min	5	7
60 min	5	6
Sokea koe (ei entsyymiä):		
60 min	>900	850

Nämä tulokset osoittavat H_2O_2:n vähentymistä hyvin matalalle tasolle näissä olosuhteissa, joissa esimerkki 4 osoitti epätäydellistä poistoa 20 minuutissa pH-arvolla 10.

Esimerkki 6

Katalaasin puhdistus

42 paino-% etanolia lisättiin esimerkissä 1 esitetyllä tavalla valmistettuun viljelysuodokseen katalaasin saostamiseksi. Sentrifugoinnin jälkeen sakka liuotettiin uudelleen ionivaihdettuun veteen alkuperäiseen tilavuuteen.

pH säädettiin arvoon 4,5 ja uudelleen liuotettua katalaasia käsiteltiin 3 painoprosentilla bentoniittia (Clarite BW) ja 3 painoprosentilla aktiivihiiltä (Picatif FGV) (huoneenlämpötila, 1 tunnin sekoitus). Bentoniitti ja aktiivihiili poistettiin sentrifugoimalla, mitä seurasi steriili suodatus.

pH säädettiin arvoon 5,0 ja suodosta käsiteltiin panosprosessissa (CM-Sepharose-hartsilla (Pharmacia) yli yön 4 °C:ssa (1 ml CM-Sepharose-hartsia 200 000 CIU-yksikköä kohti). Ioninvaihtohartsi pestiin 10 tilavuudella 0,025-M fosfaattipuskuria + 0,09-M NaCl:a pH-arvolla 5,0.

Lopullinen puhdistusvaihe suoritettiin kromatofokusointihartsilla PBE 94, valmistaja Pharmacia. Puskuri vaihdettiin dialyysillä 0,025 piperatsiini/HCl-puskuriksi pH-arvolla 5,5 ja katalaasi absorboitiin sitten PBE 94-kolonniin ja eluoitiin Polybuffer 74 HCl-liuoksella pH-arvolla 4,0 ja sen jälkeen 1-M NaCl-liuoksella. Katalaasi löydettiin 1-M NaCl-liuoksesta.

Patenttivaatimukset

1. Katalaasi, **tunnettu** siitä, että sen optimi-pH on noin 6-8 ja se on peräisin mistä tahansa kannasta Scytalidium thermophilum ATCC 28085, ATCC 48409 tai CBS 672.88 tai H. insolens UAMH 2025, IMI 158747 tai ATCC 39627.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen katalaasi, **tunnettu** siitä, että sen moolimassa on noin 92 000 ja sitä tuottaa kanta ATCC 28085.

3. Katalaasivalmiste, **tunnettu** siitä, että se on peräisin Scytalidium tai Humicola kannasta ja sillä on vähintään 75 %:n jäännösaktiivisuus 20 minuutin kuluttua 70 °C:ssa pH-arvolla 9-10,5, kun läsnä on 40 ppm polyvinyylipyrrolidonia.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen katalaasivalmiste, **tunnettu** siitä, että se on peräisin S. thermophilum kannasta, edullisesti kannasta ATCC 28085, ATCC 48409 tai CBS 671.88.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen katalaasivalmiste, **tunnettu** siitä, että se on peräisin H. insolens kannasta, edullisesti kannasta UAMH 2025, IMI 158747 tai ATCC 34627.

6. Menetelmä katalaasin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että viljellään suvun Humicola tai suvun Scytalidium katalaasia tuottavaa kantaa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kanta kuuluu Humicola-Scytalidium-kompleksiin ja on edullisesti S. thermophilum ATCC 28085, ATCC 48409 tai CBS 671.88 tai H. insolens UAMH 2025, IMI 158747 tai ATCC 34627 tai minkä tahansa näistä mutantti tai muunnos.

8. Patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu viljely suoritetaan lämpötilavälillä 40-60 °C.

9. Jommankumman patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen katalaasin tai minkä tahansa patenttivaatimuksen 3-5 mukaisen katalaasivalmisteen käyttö, **tunnettu** siitä, että se tapahtuu vetyperoksidin poistossa.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että se tapahtuu jäännösvetyperoksidin poistamiseksi kankaasta peroksivalkaisun jälkeen.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että se tapahtuu 50-75 °C:ssa pH-arvolla 7-10,5.

12. Patenttivaatimuksen 9 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että se tapahtuu kontaktilinssien käsittelemiseksi vetyperoksidilla suoritetun desinfioinnin jälkeen.

Patentkrav

1. Katalas, **kännetecknad** av att dess optimala pH är mellan ca 6 och 8 och det härstammar från vilken som helst av stammarna Scytalidium thermophilum ATCC 28085, ATCC 48409 eller CBS 672.88 eller H.insolens UAMH 2025, IMI 158747 eller ATCC 39627.

2. Katalas enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att dess molmassa är ca 92000 och den produceras av stammen ATCC 28085.

3. Katalaspreparat, **kännetecknat** av att det härstammar från en stam av Scytalidium eller Humicola och den har minst 75 % restaktivitet efter 20 minuter vid 70 °C vid ett pH mellan 9 och 10,5, i närvaro av 40 ppm polyvinylpyrrolidon.

4. Katalaspreparat enligt patentkrav 3, **kännetecknat** av att det härstammar från en stam av S.thermophilum, företrädesvis från stammen ATCC 28085, ATCC 48409 eller CBS 671.88.

5. Katalaspreparat enligt patentkrav 3, **kännetecknat** av att det härstammar från en stam av H.insolens, företrädesvis från stammen UAMH 2025, IMI 158747 eller ATCC 34627.

6. Förfarande för att producera en katalas, **kännetecknat** av att en stam som producerar katalas av släktet Humicola eller släktet Scytalidium odlas.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, **kännetecknat** av att stammen hör till komplexet Humicola-Scytalidium och är företrädesvis S.thermophilum ATCC 28085, ATCC 48409 eller CBS 671.88 eller H.insolens UAMH 2025, IMI 158747 eller ATCC 34627 eller en mutant eller variant av vilken som helst av dessa.

8. Förfarande enligt patentkrav 6 eller 7, **kännetecknat** av att nämnda odling utförs i temperaturintervallen 40-60 °C.

9. Användning av en katalas enligt någotdera av patentkraven 1 och 2 eller ett katalaspreparat enligt något av patentkraven 3-5, **kännetecknad** av att den sker i avlägsnande av väteperoxid.

10. Användning enligt patentkrav 9, **kännetecknad** av att den sker för att avlägsna restväteperoxid ur tyget efter peroxiblekning.

11. Användning enligt patentkrav 9 eller 10, **kännetecknad** av att den sker vid en temperatur mellan 50 och 75 °C vid pH mellan 7 och 10,5.

12. Användning enligt patentkrav 11, **kännetecknad** av att den sker för att behandla kontaktlinser efter utförd desinficering med väteperoxid.