



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT



FI 000116144B

(10) FI 116144 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

30.09.2005

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

C12N 9/58, C11D 3/386

(21) Patentihakemus - Patentansökning

934484

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

11.10.1993

(24) Alkupäivä - Löpdag

10.04.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

11.10.1993

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/DK92/00117

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

12.04.1991 DK 658/91 P

(73) Haltija - Innehavare

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

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Pedersen, Kim Brint, Serbiensgade 4, 4.th, 2300 Koebenhavn, TANSKA, (DK)

2 •Christiansen, Margrethe, Dyrehavevej 12, st., 2930 Klampenborg, 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

**Uudet proteaasit
Nya proteaser**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:

DSM 6260 DSM
DSM 6992 DSM

DSM 6331 DSM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP 335023 A1, EP 314401 A2, EP 224246 B1, WO 8803948 A1

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee pesuaine proteaasien aluetta. Tarkemmin sanottuna keksintö kohdistuu uusiin alkalisiin proteaaseihin, jotka ovat peräisin Dendryphiella- ja (tai) Scolecobasidium-sukujen (suvun) imperfect fungi -kannoilta. Ennen kaikkea keksintö kohdistuu proteaasien valmistusmenetelmään, proteaasien käyttöön pesuaineantisyymeinä ja pesuaine koostumuksiin, jotka sisältävät keksinnön mukaisia proteaaseja.

Uppfinningen avser området av detergentproteaser. Mer specifikt sagt geller uppfinningen nya, alkaliska proteaser, vilka härstammar från stammar av imperfekt fungi av släkten Dendryphiella och (eller) Scolecobasidium. Framför allt inriktar uppfinningen sig på processen för att framställa proteaser, deras användning som detergent-enzym och detergentkompositioner, som innehåller proteaser enligt uppfinningen

Uudet proteaasit - Nya proteaser

Esillä oleva keksintö koskee pesuaineproteaaseja. Tarkemmin määriteltynä esillä oleva keksintö kohdistuu uusiin alkali-
5 siin proteaaseihin, jotka ovat peräisin Dendryphiella- ja (tai) Scolecobasidium-sukujen (suvun) imperfect fungi -kannoilta. Ennen kaikkea esillä oleva keksintö kohdistuu proteaasien valmistusmenetelmään, proteaasien käyttöön pesuaine-entsyyminä sekä esillä olevan keksinnön mukaisia proteaaseja
10 sisältäviin pesuainekoostumuksiin.

Pesuaine-entsyymejä on myyty pitempään kuin 20 vuoden ajan, ja niille on nyt luotu varma asema sekä jauhemaisten että nestemäisten pesuaineiden normaaleina ainesosina kaikkialla maailmassa. Sen suuntauksen myötä, että peseminen suoritetaan
15 alemmassa lämpötilassa, detergenttientsyymien kulutus on nousut viimeisten vuosien aikana. Pesuaineformulaatioissa käytetyt entsyymit sisältävät proteaaseja, lipaaseja, amylaaseja, sellulaaseja sekä muita entsyymejä tai niiden seoksia. Kaupallisesti tärkeimpiä ovat proteaasit.

20 Pesuaineproteaaseja on kehitetty eristämällä luonnosta löydettyjä proteaaseja, minkä jälkeen niitä on testattu pesuaineformulaatioissa. Useimmat pesuaineproteaasit saadaan Bacillus-suvun jäseniltä. Uusia proteaasityyppejä tulee jatkuvasti markkinoille tarjoten mahdollisuuden antaa parempi hinnan ja
25 tehon suhde erilaisissa tarkoin määrätyissä olosuhteissa.

Kaupallisten proteaasituotteiden esimerkkejä ovat AlcalaseTM, EsperaseTM sekä SavinaseTM, joita kaikkia Novo Nordisk A/S, Tanska, toimittaa. Nämä ja samankaltaiset entsyymituotteet, jotka ovat peräisin muista kaupallisista lähteistä, ovat ak-
30 tiivisia pesuaineliuoksissa, se on pH-arvoissa, jotka ovat alueella 8-11, sekä sekvestraus-, pinta-aktiivisuus- ja valkaisuaineiden, kuten esimerkiksi natriumberporaatin läsnä ollessa. AlcalaseTM-proteaasia tuotetaan Bacillus licheniformis-

lajin kannoilla. Alkalofiilisten bakteereiden kantoja viljelemällä saadaan EsperaseTM- ja SavinaseTM-proteaaseja.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti annetaan käyttöön uusia pesuaineproteaaseja. Ensimmäisessä näkökohdassaan esillä
5 oleva keksintö antaa käyttöön proteaasin, joka on saatavissa Dendryphiella- tai Scolecobasidium-suvun kannalta.

Tarkemmin määrättyssä näkökohdassa esillä oleva keksintö antaa käyttöön proteaasin, jonka pI on noin 9,1, molekyylipaino on noin 18 - 20 kD, ja joka on aktiivinen hemoglobiinia, kaseiinia,
10 nia, kuorittua maitoa ja Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA:ta kohtaan, tai jonka pI > 9,5 ja molekyylipaino noin 28 kD.

Seuraavassa näkökohdassa esillä oleva keksintö antaa käyttöön proteaasien valmistusmenetelmän, joka käsittää Dendryphiella tai Scolecobasidium-suvun proteaasia tuottavan kannan viljelemisen
15 sopivassa kasvatusalustassa, joka sisältää hiilen ja typen lähteet sekä epäorgaanisia suoloja, minkä jälkeen haluttu entsyymi otetaan talteen.

Kolmannessa näkökohdassaan esillä oleva keksintö antaa käyttöön proteaasin valmistusmenetelmän, joka käsittää proteaasia koodittavan DNA-fragmentin eristämisen, DNA-fragmentin yhdistämisen
20 sopivan ilmentymissignaalin kanssa sopivassa plasmidivektorissa, plasmidivektorin viemisen sopivaan isäntään joko autonomisesti replikoituvana plasmidina tai kromosomiin integroituna, isäntäorganismien viljelemisen olosuhteissa, jotka johtavat proteaasin ilmentymiseen, sekä proteaasin talteenoton kasvatusalustasta.
25

Neljännessä näkökohdassaan esillä oleva keksintö esittää vaatimukset proteaasien käytölle pesuaineentsyymeinä. Tämän
30 näkökohdan tarkemmin määritellyssä sovellutusmuodossa annetaan käyttöön pesuainekoostumuksia, jotka sisältävät proteaaseja. Tämän näkökohdan vielä eräässä spesifisessä sovellutusmuodossa pesuainekoostumukset annetaan käyttöön pesuaineen lisäaineena, mieluummin pölyämättömänä granulaattina, stabiloituna nesteenä, lietteenä tai suojattuna entsyyminä.

Organismi

Esillä olevan keksinnön mukaisia uusia pesuaineproteaaseja voidaan hankkia Dendryphiella- ja Scolecobasidium-sukujen jäseniltä. Dendryphiella ja Scolecobasidium kuuluvat Fungi imperfectiin. D. salina (Sutherland) Pugh et Nicot (synonyymit: S. salinum (Sutherland) M.B. Ellis, Cercospora salina (Sutherland) ja D. arenaria Nicot (synonyymit: S. arenarium (Nicot) M.B. Ellis) ovat erittäin läheisiä lajeja, jotka tavallisesti eristetään merikasvupaikoilta, lähiranta-alueilta.

Esimerkkejä ovat kannat D.arenaria Nicot, DSM 6260, joka alunperin eristettiin hajoavasta Nereocystis-levästä, sekä D. salina (Sutherland) Pugh et Nicot, DSM 6331. Muita lajeja ovat esimerkiksi D. vinosa (Bert & Curt) Reisinger; D. infuscans (Thumen) M.B. Ellis; S. cateniphorum Matsushima; S. echinophilum (Massalongo) Sutton; S. fusiforme Matsushima; S. longiphorum Matsushima; S. salmonicolor Shearer; S. terreum Abbot; S. tshawytschae (Doty & Slater) McGinnis & Ajello; S. constrictum Abbot; S. humicola Barron & Bush; S. obovatum Matsushima; S. variabile Barron & Busch; S. anelli Graniti; S. verruculosum Roy, Dwivedi & Mishra; S. gyrocarpi M.B. Ellis.

Eräs esimerkki on S. gyrocarpin kanta M.B. Ellis, DSM 6332.

Mikro-organismien kasvattaminen

Mikro-organismeja voidaan kasvattaa aerobisissa olosuhteissa kasvatusalustassa, joka sisältää assimiloituvia hiilen ja typen lähteitä yhdessä muiden välttämättömien ravintoaineiden kanssa, kun alustan koostuu tunnetun tekniikan periaatteiden mukaisesti. D. salinan ja D. arenarian kantoja voidaan viljellä alustassa, joka sisältää merivettä tai merisuoloja mutta se ei ole välttämätöntä.

Organismit pystyvät kasvamaan huoneenlämpötilassa monilla yleisesti käytetyillä agar-alustoilla, kuten PDA:lla (Potato Dextrose Agar), YPG:llä (4 g/l hiivauutetta; 15 g/l glukosia; 1 g/l K_2HPO_4 :ää; 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:ta; 20 g/l agaria; pH

7,3-7,5 ennen sterilointia) sekä Bacto Yeast Morphology Agarilla (Difco™). D.arenaria ja D. salina pystyvät kasvamaan myös KMV-agarilla (1 g/l glukoosia; 0,1 g/l hiivauutetta; 0,1 g/l Bacto™-peptonia; 1 g/l gelatiinihydrolysaattia, 12 g/l agaria; 40 g/l Sigma™:n merisuoloja (Sea Salts)).

Sopivia hiilenlähteitä ovat hiilihydraatit, kuten esimerkiksi sakkaroosi, glukoosi ja tärkkelys, tai hiilihydraattia sisältävät materiaalit, kuten esimerkiksi soijapapuryynit, pellavansiemenjauhot, viljanjyvät, maltaat, riisi ja durra. Alustaan sisällytetty hiilihydraattikonsentraatio voi vaihdella laajalti, esim. 25-0,1 prosentin välillä, mutta tavallisesti 1-10 prosenttia on sopiva alue.

Typen lähde kasvatusalustassa voi olla luonteeltaan epäorgaaninen ja (tai) orgaaninen. Sopivia epäorgaanisen typen lähteitä ovat nitraatit ja ammoniumsuolat. Fermentaatioissa käytetään säännöllisesti jokseenkin suurta joukkoa yhdisteitä, jotka valitaan orgaanisten tyyppiyhdisteiden piiristä. Valaisevia esimerkkejä ovat soijapapujauho, pellavansiemenjauho, kaseiini, maissi, maissinliuotusneste, hiivauute, urea ja albumiini. Kasvatusalustan tulisi lisäksi sisältää tavallisia hivenaineita.

Proteaasien talteenotto ja puhdistaminen

Käymisen jälkeen voidaan sienien tuottamat ekstrasellulaariset proteaasit ottaa talteen ja puhdistaa tunnetun tekniikan periaatteiden mukaisesti, esim. käyttämällä sellaisia vaiheita kuten esimerkiksi karkeiden ainesten poistamista sentrifugoimalla tai rumpusuodatuksella, kasvatusliemen konsentrointia haihduttamalla tai ultrasuodatuksen avulla sekä puhdistamista anioninvaihtokromatografian avulla. Puhdistettuihin proteaaseihin voidaan lopuksi lisätä säilöntäaineita.

Yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetut proteaasit

Esillä olevan keksinnön mukaiset proteaasit voidaan saada myös yhdistelmä-DNA-tekniikalla.

Proteaasien valmistusmenetelmä voi käsittää proteaasia koodittavan DNA-fragmentin eristämisen, DNA-fragmentin yhdistämisen sopivan ekspressiosignaalin kanssa sopivassa plasmidivektorissa, plasmidivektorin viemisen sopivaan isäntään joko
5 autonomisesti replikoituvana plasmidina tai kromosomiin integroituna, isäntäorganismien viljelemisen olosuhteissa, jotka johtavat proteaasin ilmentymiseen, ja proteaasin talteenottamisen kasvatusalustasta. Erilaiset vaiheet, jotka muodostavat tämän yhdistelmämenetelmän, ovat tutkimustyön piirissä sinänsä tunnettuja menetelmiä.
10

E. coli tai *Bacillus*-, *Aspergillus*- tai *Streptomyces*-suvun jäsenet ovat edullisia organismeja.

Proteolyyttisen aktiivisuuden määrittäminen

Proteolyyttinen aktiivisuus määritetään käyttäen kaseiinia substraattina. Yksi kaseiiniproteaasiyksikkö (CPU) määritetään entsyymien määränä, joka vapauttaa 1 millimoolin primäärisiä aminoryhmiä (määritetty vertailemalla seriinistandardin kanssa) minuutissa standardiolosuhteissa, se on inkuboimalla
15 30 minuutin ajan 25°C:ssä, pH 9,5:ssä. Mainoslehtinen AF 228, joka kuvaa analyysimenetelmää ja joka sisällytetään esillä olevaan hakemukseen viitteenä, on pyynnöstä saatavissa Novo Nordisk A/S:ltä, Tanskasta.
20

Entsyymi

Esillä olevan keksinnön mukaiset entsyymit ovat uusia pesuaineproteaaseja. Entsyymit ovat saatavissa *Dendryphiella*- ja *Scolecobasidium*-sukujen kannoilta, esimerkiksi *D. salinan*, *D. arenarian* tai *S. gyrocarpin* kannoilta, esim. *D.arenarian* kannalta DSM 6260, *D. salinan* kannalta DSM 6331 tai *S. gyrocarpin* kannalta DSM 6332.
25

Esillä olevan keksinnön mukaiset proteaasit ovat alkalisia proteaaseja, joiden isoelektriset pisteet (pI) LKB:n PAG-levyillä (pH 3,5-9,5) määritettyinä ovat 8,0:n yläpuolella.
30

Esillä olevan keksinnön mukaisella, erityisellä proteaasilla pI on noin 9,1, molekyylipaino noin 18-20 kD:tä, proteaasi on aktiivinen hemoglobiinia, kaseiinia, kuorittua maitoa ja Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA:ta kohtaan, sen immunokemialliset ominaisuudet ovat identtiset tai osittain identtiset proteaasien, jotka ovat peräisin kannasta D. arenaria, DSM nro 6260, tai kannasta D. salina, DSM nro 6331, ominaisuuksien kanssa.

Esillä olevan keksinnön mukainen toinen proteaasi on proteaasi, jonka pI > 9,5, molekyylipaino on noin 28 kD ja immunokemialliset ominaisuudet ovat identtiset tai osittain identtiset proteaasien, jotka ovat peräisin Dendryphiella arenarialta, DSM nro 6260, immunokemiallisten ominaisuuksien kanssa.

Immunokemialliset ominaisuudet

Immunokemialliset ominaisuudet voidaan määrittää immunologisilla ristireaktioidenttisyyskokeilla. Identtisyyskokeet voidaan suorittaa hyvin tunnetulla Ouchterloney-kaksoisimmuno-diffuusiomenetelmällä tai peräkkäisellä, ristiinmenevällä immunoelektroforeesilla N.H. Axelsenin mukaan; Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques; Blackwell Scientific Publications (1983), kappaleissa 5 ja 14. Termejä "antigeeninen identtisyys" ja "osittainen antigeeninen identtisyys" kuvataan samassa kirjassa, kappaleissa 5, 19 ja 20.

Pesuainekoostumukset

Esillä olevan keksinnön mukaiset pesuainekoostumukset voivat sisältää yhden tai useampia pinta-aktiivisia aineita, jotka voivat olla anioniaktiivisia, ionittomia, kationiaktiivisia, amfoteerisiä tai zwitterionityyppiä tai näiden seoksia. Anioniaktiivisten pinta-aktiivisten aineiden tyypillisiä esimerkkejä ovat lineaariset alkyylibentseenisulfonaatit (LAS), alkyyilisulfaatit (AS), alfaolefiinisulfonaatit (AOS), alkoholi-
lietoksisulfaatit (AES) sekä luonnonmukaisten rasvahappojen alkalimetallisuolat. Ionittomien pinta-aktiivisten aineiden
esimerkkejä ovat alkyylipolyetyleeniglykolieetterit, nonyyli-
fenolipolyetyleeniglykolieetterit, sakkaroosin ja glukoo-

rasvahappoesterit sekä polyetoksiloidun alkyyliglukosidin esterit.

Esillä olevan keksinnön mukainen pesuainekoostumus voi sisältää myös muita pesuaineen ainesosia, jotka ovat tunnettuja
5 kyseessä olevan tekniikan piirissä, kuten esimerkiksi muita aineita kuin pesuaineen pesuaktiivisia aineita, valkaisuaineita, valkaisun aktivaattoreita, korroosionestoaineita, sekvestrausaineita, harmaantumisen estoaineita, hajusteita, vakautteita entsyymejä ja valkaisuaineita varten, formuloin-
10 nin apuaineita, optisia kirkasteita, vaahdotusaineita, kela-
toivia aineita, täyteaineita, kankaan pehmentäjiä, jne. Esillä olevan keksinnön mukainen pesuainekoostumus voidaan formuloida suurin piirtein, kuten J. Falben julkaisussa kuvataan [Falbe, J.; Surfactants in Consumer Products. Theory, Techno-
15 logy and Application; Springer Verlag 1987, katso erityisesti kappaletta, jonka otsikko on "Frame formulations for liquid/-
powder heavy-duty detergents"].

Tällä hetkellä on suunniteltu, että esillä olevan keksinnön mukainen pesuainekoostumus voi sisältää entsyymivalmistetta
20 määrän, joka vastaa 0,0005-0,5 CPU:ta proteolyyttistä entsyymiä litraa kohti pesuliuosta.

Esillä olevan keksinnön mukaiset pesuainekoostumukset voidaan formuloida jollain sopivalla tavalla kuten esimerkiksi puute-
reina, nesteinä jne.

25 Esillä olevan keksinnön mukainen pesuainekoostumus voi sisältää edullisesti yhden tai useampia entsyymejä, esim. lipaaseja, amylaaseja, sellulaaseja, oksidaaseja ja (tai) peroksidaaseja, joita tavanomaisesti sisällytetään pesuainekoostumukseen.

30 Esillä olevan keksinnön mukainen proteaasi voidaan sisällyttää pesuainekoostumukseen lisäämällä erillisiä lisäaineita, jotka sisältävät pesuaineproteaasin, tai lisäämällä yhdistetyn lisäaineen, joka sisältää erilaisia pesuaine-entsyymejä.

- Esillä olevan keksinnön lisäaine voidaan formuloida esimerkiksi granulaatteina, nesteinä, lietteinä jne. Edullisia lisäaineformulaatioita ovat pölyämättömät granulaatit tai stabiloidut nesteet. Pölyämättömät granulaatit voidaan valmistaa esimerkiksi GB-patenttijulkaisun 1 362 365 tai US-patentin 4 106 991 mukaisesti, tai ne voidaan päällystää tekniikan tason mukaisin menetelmin. Puhdistusaine-entsyymit voidaan sekoittaa ennen rakeistusta tai sen jälkeen. Nestemäiset entsyymivalmisteet voidaan stabiloida esimerkiksi lisäämällä polyolia, kuten esimerkiksi propyleeniglykolia, sokeria tai sokerialkoholua, maitohappoa tai boorihappoa pystytettyjen menetelmien mukaisesti. Muut entsyymivakautteet ovat alalla hyvin tunnettuja. Suojattuja entsyymejä voidaan valmistaa EP-patenttijulkaisussa 238 216 julkaistulla tavalla.
- 15 Esillä olevaa keksintöä kuvataan edelleen seuraavissa esimerkeissä, joiden tarkoituksena ei ole millään tavalla rajoittaa esillä olevan keksinnön piiriä, joka esitetään patenttivaatimuksissa.

Esimerkki 1

20 Viljelyesimerkki

Kantaa *D. arenaria*, DSM nro 6260, viljeltiin 18 °C:ssa, 7 päivän ajan, pyörivällä ravistelupöydällä (250 kierrosta minuutissa), 100-500 ml:n vetoisissa, suuntauslevyllä varustetuissa Erlenmayer-pulloissa, jotka sisälsivät 100 ml alustaa, jolla oli seuraava koostumus (litraa kohti):

30	Soijaryynejä	50 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	10 g
	K ₂ HPO ₄	2 g
	Glukoosia	10 g
	Pluronic ^R L-61	0,1 ml

pH säädetty 7,0:ksi ennen autoklaavikäsittelyä.

Viljelyn jälkeen kasvatusliemen entsyymiaktiivisuus oli 3,7 CPU/l.

Kantaa D. salina, DSM nro 6331, kasvatettiin samalla tavalla, paitsi että kasvatusalusta sisälsi edelleen Sigman merisuol-
5 ja (Sea Salts, Sigma) 40 g/l.

Viljelyn jälkeen kasvatusliemen entsyymiaktiivisuus oli 5,2 CPU/l. Liemi sisälsi yhden pääproteasikomponentin, jonka pI oli noin 9,1.

Esimerkki 2

10 Puhdistusesimerkki

D. arenaria DSM 6260:n kasvatusliemi, joka saatiin esimerkin
1 mukaisesti, sentrifugoitiin Beckman J-6 -sentrifugissa nopeudella 4000 kierrosta minuutissa 30 minuutin ajan. Supernatantti koottiin, ja se suodatettiin 10 µm:n suodatinverkon
15 läpi.

Täten saatiin 7,5 litraa supernatanttia, joka myöhemmin konsentroidtiin 1,0 kg:ksi ultrasuodattamalla se Filtron-laitteistoa käyttämällä, polysulfonimembraanilla, jonka katkaisuraja oli 1000.

20 Proteaasit puhdistettiin edelleen anioninvaihtajakromatografian avulla, jota HPLC-pylväässä suoritettu affiniteettikromatografia seurasi.

Anioninvaihtokromatografiaa varten yllä saadun konsentraatin annettiin reagoida eräprosessina DEAE-Sephadex A-50:n kanssa
25 25-millimolaarisessa boraatissa, joka sisälsi 5 mmoolia CaCl₂:ta, pH 8,5. Proteaasit jäivät materiaaliin, joka ei sitoutunut matriisiin.

Anioninvaihtajasta saadun proteaasia sisältävän materiaalin affinitettikromatografia suoritettiin HPLC-pylväässä.

30 Täten saatu proteaasivalmiste sisälsi kaksi proteaasia. D. arenarian kantaa DSM nro 6260 viljelemällä saatua proteaasi-

valmistetta luonnehtivat pI 9,1 isoelektrisellä fokusoinnilla LKB Ampholine^R PAG -levyillä määritettynä (pH 3,5 - 9,5) sekä molekyylipaino, joka oli noin 20 000 SDS-PAGE:lla määritettynä. Pienempää komponenttia luonnehtivat pI >9,5 sekä molekyylipaino, joka oli noin 28 000. SDS-PAGE:n perusteella proteaasit käsittivät noin 50 %:a kokonaisproteiinisisällöstä.

Pääproteaaasikomponentille oli edelleen ominaista sen kyky pilkkoa kaseiinia (Hammerstein^R), hemoglobiinia, kuorittua maitoa sekä N-sukkinyyli-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidia. Proteaasilla ei ollut ollenkaan tai sillä oli erittäin alhaista aktiivisuutta kromogeenisia substraatteja BAPNA:ta (N- α -bentsoyyli-DL-Arg-p-nitroanilidi):a ja Z-Glu-pNA(N-bentsoyylioksykarbonyyli-Glu-p-nitroanilidi):a kohtaan. EDTA ei inhiboinut proteaasia.

Proteaasi, joka saatiin viljelemällä D. salinan kantaa DSM nro 6331, puhdistettiin suurin piirtein yllä kuvatulla tavalla. Lisäksi sitä luonnehti molekyylipaino, joka oli noin 18 000 - 20 000 SDS-PAGE:lla määritettynä, sen kyky pilkkoa kaseiinia (Hammarsten^R), hemoglobiinia, kuorittua maitoa sekä N-sukkinyyli-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidia. Proteaasilla ei ollut ollenkaan tai sillä oli alhaista aktiivisuutta kromogeenisia substraatteja BAPNA:ta ja Z-Glu-pNA:ta kohtaan.

Esimerkki 3

Pesusuoritus

Pesusuoritustestit pantiin täytäntöön mallipesussa, jossa käytettiin ruohonesteen likaamaa puuvillaa 20 °C:ssa ja joka kesti 10 minuutin ajan.

Kokeessa käytettiin American Type -pesuaineformulaatioita, pesuainejauhekoostumusta ja nestemäistä pesuainekoostumusta. Pesutesteihin käytettiin esimerkissä 2 kuvattuja entsyymivalmisteita. Käytetty entsyymiannostus mainitaan esimerkkinä alla esitetyssä taulukossa. Tekstiilin ja pesunesteen välinen suhde oli 6 g tekstiiliä litraa kohti pesunestettä.

Kaupallista, jauhemaista American Type -pesuainetta käytettiin 2,0 g/l. Pesuaine liuotettiin veteen, jonka kovuus oli noin 6 °dH (saksalaista kovuutta). PH oli 9,5.

5 Kaupallista, nestemäistä American Type -pesuainetta käytettiin 2,0 g/l. Pesuaine liuotettiin veteen, jonka kovuus oli noin 6 °dH. PH oli 7,8.

10 Pesun jälkeen kangasta huuhdottiin juoksevan vesijohtoveden alla 25 minuutin ajan, ja se kuivattiin ilmassa. Proteaasin teho määritettiin remission (%R) muutoksena (R), joka mitattiin Datacolor Elrephometer 2000:lla, R:n ollessa remissio, joka on saatu lisätyn proteaasin kanssa suoritettun pesun jälkeen vähennettynä remissiolla, joka on saatu ilman proteiini-lisäystä suoritettun pesun jälkeen.

Tulokset esitetään taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1

Remissioero, R, mitattuna jauhemaalissa American Type -pesuainekoostumuksessa suoritettun pesun jälkeen

Entsyymiannos (CPU/l)	0,0025	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2
D. arenaria - proteaasi	4,0	6,6	11,7	20,2	21,6	21,6
D. salina -proteaasi	6,5	14,3	20,6	23,4	24,2	-

5 Taulukko 2

Remissioero, R, mitattuna nestemäisessä American Type -pesuainekoostumuksessa suoritettun pesun jälkeen.

Entsyymiannos (CPU/l)	0,01	0,04	0,08	0,16	0,50	1,0
D. arenaria -proteaasi	7,1	13,4	16,5	18,2	-	-
D. salina -proteaasi	5,2	12,5	15,8	17,9	19,5	20,3

Kuten remissioerot osoittavat, esillä olevan keksinnön mukaiset proteaasit soveltuvat käytettäväksi detergenttientsyymeinä.

Esimerkki 4

5 Erillisten proteaasikomponenttien eristäminen

D. arenaarian kantaa DSM 6260 viljeltiin Chemap-käymisastias-
sa 160 tunnin ajan 10 litrassa seuraavaa substraattia:

	Soijahiutaleita	50 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
10	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	10 g/l
	K ₂ HPO ₄	2 g/l
	Glukoosia	10 g/l
	Pluronic ^R L61	1 ml/l

pH säädetty 7,0:ksi ennen sterilointia

- 15 Käymisen kuluessa pH pidettiin 8,0:ssa lisäämällä laimeaa H₃PO₄:a.

Kasvatusliemi väkevöitiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla.

- 20 Konsentraatin pH säädettiin 7,5:ksi. 100 ml:aan tätä konsent-
raattia lisättiin 70 ml asetonia, ja saostuma poistettiin
sentrifugoimalla ja heitettiin pois. Supernatanttiin lisät-
tiin 100 ml asetonia. Proteaasit sisältävä saostuma otettiin
talteen sentrifugoimalla, ja se liuotettiin 25 millimolaari-
seen boraattiin, joka oli 5 millimolaarinen CaCl₂:n suhteen,
pH 8,5.

- 25 Tämä materiaali puhdistettiin anioninvaihtajalla ja affini-
teettikromatografialla, kuten kuvataan esimerkissä 2.

- 30 Kaksi proteaasia eluaatista, joka oli saatu HPLC-affiniteet-
tikromatografiasta, erotettiin kationinvaihtokromatografian
avulla Mono S HR 5/5-pylväässä (Pharmacia). HPLC-pylvästä
saatua eluaattia dialysoitiin yön yli puskuria vastaan, joka
sisälsi 20 millimoolia Na-asetaatia, 50 mmoolia boorihappoa,

2 millimoolia CaCl_2 :a; pH 4,5. Tämä pantiin Mono S -pylväseen, josta kaksi proteaasia eluoitiin NaCl-gradientissa erillisissä jakeissa.

5 SDS-PAGE:n perusteella proteaasin pääkomponentin, jonka pI oli 9,1 ja molekyylipaino oli 20 000, puhtaus oli enemmän kuin 90 %.

Pieni proteaasikomponentti, jonka pI > 9,5 ja molekyylipaino oli 28 000, oli yli 50-prosenttisesti puhdas, mutta se sisälsi vielä merkittävän määrän toista proteiinia, jonka molekyylipaino SDS-PAGE:lla määritettynä oli noin 33 000. Kontami-
10 noivalla proteiinilla ei ollut yhtään proteolyyttistä aktiivisuutta.

Esimerkki 7

N-terminaaliset sekvenssit

15 Proteaasivalmisteiden pääkomponenteille, joita yllä kuvattiin, suoritettiin N-terminaalisen sekvenssin määrittäminen.

Pääkomponentin, joka eristettiin *D. arenarian* kannalta DSM nro 6260, N-terminaalisen sekvenssin havaittiin olevan seuraava:

20 A-T-V-R-G-G-D-A-Y-Y-I-N-R-A-G-R-S-S-V-G-F-S-V-S-X-G-Y-V-...

Pääkomponentin, joka eristettiin *D. salinan* kannalta DSM nro 6331, N-terminaalisen sekvenssin havaittiin olevan seuraava:

X-X-V-R-G-G-D-A-Y-Y-I-N-R-A-G-R-X-S-V-G-F-S-V-S-G-G-Y-V-S-A-...

25 Dendryphiella-proteaasien N-terminaaliset sekvenssit ovat käytännöllisesti katsoen identtiset, ja sen tähden proteaasit ovat toisilleen läheisiä.

Patenttivaatimukset

1. Proteaasi, **tunnettu** siitä, että se on saatavissa *Dendryphiella*- tai *Scolecobasidium*-suvulta ja että sillä on seuraavat ominaisuudet:

- 5 (a) pI on noin 9,1;
- (b) molekyylipaino on noin 18 - 20 kD;
- (c) se on aktiivinen hemoglobiinia, kaseiinia, kuorittua maitoa sekä Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA:ta kohtaan;

tai

- 10 (d) pI >9,5;
- (e) molekyylipaino on noin 28 kD.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteaasi, **tunnettu** siitä, että se on saatavissa *D. salinan*, *D. arenarian*, *D. infuscan-*
15 *sin*, *D. vinosan*, *S. gyrocarpin*, *S. fusiformen*, *S. anellin*, *S. constrictumin* tai *S. cateniphorum* kannalta tai niiden mutanteilta tai varianteilta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteaasi, **tunnettu** siitä, että se on saatavissa *D. salinan* (Sutherland) Pugh & Nicot
20 tai *D. arenarian* Nicot tai *S. gyrocarpin* M.B. Ellis -kannalta tai niiden mutanteilta tai varianteilta.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen proteaasi, **tunnettu** siitä, että se on saatavissa *D. arenarian* Nicot-kannalta DSM nro 6260 tai *D. salinan* (Sutherland) Pugh et Nicot -kannalta DSM
25 nro 6331 tai *S. gyrocarpin* M.B. Ellis -kannalta nro 6332 tai niiden mutanteilta tai varianteilta.

5. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaisten proteaasien valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää suvun *Dendryphiella* tai *Scolecobasidium* proteaasia tuottavan kannan viljelemisen sopivassa ravintoalustassa,

joka sisältää hiili- ja typpilähteitä sekä epäorgaanisia suoloja, minkä jälkeen haluttu entsyymi otetaan talteen.

6. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaisen proteaasin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä
5 käsittää proteaasia koodittavan DNA-fragmentin eristämisen, DNA-fragmentin yhdistämisen sopivan ilmentymissignaalin kanssa sopivassa plasmidivektorissa, plasmidivektorin viemisen sopivaan isäntään joko autonomisesti replikoituvana plasmidina tai kromosomiin integroituna, isäntäorganismien kasvattamisen olosuhteissa, jotka johtavat proteaasin ilmentymiseen, ja
10 proteaasin talteen ottamisen kasvatusalustasta.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että isäntäorganismi on *E.coli* tai *Bacillus*-, *Aspergillus*- tai *Sreptomycetes*-suvun jäsen.

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

9. Pesuainekoostumus, **tunnettu** siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaisen proteaasin.

20 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen pesuainekoostumus, **tunnettu** siitä, että se lisäksi sisältää yhden tai useampia muita entsyymejä, nimenomaan amylaaseja, lipaaseja, sellulaaseja, oksidaaseja ja (tai) peroksidaaseja.

25 11. Pesuaineen lisäaine, **tunnettu** siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaisen proteaasin, joka annetaan käyttöön pölyämättömän granulaatin, nesteen, nimenomaan stabiloidun nesteen, lietteen tai suojatun entsyymin muodossa.

Patentkrav

1. Proteas, **kännetecknat** av att det kan erhållas från släkten *Dendryphiella*- eller *Scolecobasidium* och att det har följande egenskaper:

5 (a) pI är ca 9,1;

(b) molekylvikten är ca 18 - 20 kD;

(c) det är aktivt mot hemoglobin, kasein, skummad mjölk samt Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA;

eller

10 (d) pI >9,5;

(e) molekylvikten är ca 28 kD.

2. Proteas enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att det kan erhållas från stammen *D. salina*, *D. arenaria*, *D. infuscans*, *D. vinosa*, *S. gyrocarp*, *S. fusiforme*, *S. anelli*, *S.*
15 *constrictum* eller *S. cateniphorum* eller från deras mutanter eller varianter.

3. Proteas enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att det kan erhållas från stammen *D. salina* (Sutherland) Pugh & Nicot eller *D. arenaria* Nicot eller *S. gyrocarp* M.B Ellis eller
20 från deras mutanter eller varianter.

4. Proteas enligt patentkrav 3, **kännetecknat** av att det kan erhållas från stammen *D. arenaria* Nicot-stam DSM nr 6260 eller *D. salina* (Sutherland) Pugh et Nicot DSM nr 6331 eller *S. gyrocarp* M.B Ellis nr 6332 eller från deras mutanter eller
25 varianter.

5. Förfarande för att framställa proteas enligt vilket som helst av patentkraven 1-4, **kännetecknat** av att förfarandet innefattar en stam av *Dendryphiella* eller *Scolecobasidium* som producerar proteas i ett för odling lämpligt näringssubstrat,

innefattande kol- och kvävekällor samt oorganiska salter, varefter önskat enzym tas tillvara.

6. Förfarande för att framställa ett proteas enligt vilket som helst av patentkraven 1-4, **kännetecknat** av att förfarandet innefattar isolering av ett proteas som kodar DNA-fragment, kombination av DNA-fragmentet med en lämplig expressionssignal i en lämplig plasmidvektor, införande av plasmidvektorn i en lämplig värd antingen som en autonomiskt replikerande plasmid eller integrerad i en kromosom, odling av värdorganismen under förhållanden som leder till expression av proteaset, och återvinning av proteaset från näringssubstratet.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, **kännetecknat** av att värdorganismen är *E. coli* en medlem av släktet eller *Bacillus*, *Aspergillus* eller *Streptomyces*.

8. Användning av ett proteas enligt vilket som helst av patentkraven 1-4 som ett tvättmedelsenzym.

9. Tvättmedelssammansättning, **kännetecknad** av att den innehåller ett proteas enligt vilket som helst av patentkraven 1-4.

10. Tvättmedelssammansättning enligt patentkrav 9, **kännetecknad** av att den dessutom innehåller ett eller flera andra enzymer, uttryckligen amylaser, lipaser, cellulaser, oxidaser och (eller) peroxidaser.

11. Tillsatsmedel för tvättmedel, **kännetecknat** av att det innehåller ett proteas enligt vilket som helst av patentkraven 1-4, som administreras i form av icke-dammande granulat, vätska, uttryckligen stabiliserad vätska, suspension eller skyddat enzym.