FI000110194B



(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 110194 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **13.12.2002**

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

D21C 9/00, C12S 3/08

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **934655**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **21.10.1993**

(24) Alkupäivä - Löpdag **10.04.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **21.10.1993**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/DK92/00114**

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

22.04.1991 DK 738/91 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 •Leclerc,Marc, 7, rue A.-Petit, 92260 Fontenay-aux-Roses, RANSKA, (FR)

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

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Sellulaasin käyttö massan käsittelyyn
Användning av cellulase för behandling av massa

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 87242 (D 21C 9/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Runsaasti endoglukanaasia ja vähän tai ei lainkaan sellobiohydrolaasia sisältävää sellulaasivalmistetta voidaan käyttää paperimassan käsittelyyn mm. massan suotautumisominaisuuksien parantamiseksi.

Ett cellulaspreparat innehållande rikligt med endoglukanas och litet eller inte alls cellobiohydrolas kan användas för behandling av pappersmassa bl.a. för att förbättra massans avvattningsegenskaper.

Sellulaasin käyttö massan käsittelyyn - Användning av cellulase för behandling av massa

Tämä keksintö koskee sellulaasivalmisteen käyttöä massan käsittelyyn.

Paperinvalmistukseen käytettävän massan valmistuksessa massan suotautumisominaisuudet eivät aina ole riittävän hyviä, jolloin paperilinjan kapasiteetti voi laskea. Massan suotautumisominaisuudet määritetään usein Schopper-Riegler -testillä (korkea SR-arvo vastaa huonoa suotautumista) tai Canadian Standard Freeness -testillä (matala CSF-arvo vastaa huonoa suotautumista). Epätyydyttävää suotautumista voi ilmetä varsinkin valmistettaessa massaa materiaalista, joka jo kerran on läpikäynyt massanvalmistus- ja kuivatusprosessin, kuten esimerkiksi kuivattu ensiömassa, uusiokuitu tai keräyspaperi.

Patenteissa EP 262,040 (Cellulose du Pin) ja EP 351,655 (Cultor) kuvataan suotautumiskyvyn paranemista käyttämällä sellulaasia ja hemisellulaasia massan valmistuksessa. Patenteissa JP-A 59-9299 ja JP-A 63-59494 kuvataan sellulaasin käyttöä valmistettaessa massaa korkeassa pH-arvossa (yli 9) musteen poistumisen parantamiseksi jätepaperista.

Kraft-keitto, massa- ja paperiteollisuudessa laajalti käytetty prosessi, käsittää massan alkalisen sulfaattikeiton, jossa 95% ligniinistä poistuu. Jäljelle jäävä 5% ligniiniä antaa massalle tummanruskean värin, jolla on taipumus tummentua UV-valossa tai hapetuksen seurauksena. Jotta saataisiin valkoista massaa korkealuokkaisen paperin valmistamiseksi, massan ruskea väri poistetaan monivaiheisessa valkaisuprosessissa käyttämällä klooria tai klooridioksidia.

Valkaisuprosessissa käytetyn kloorin määrän vähentämisek-

si on ehdotettu, että massa käsitellään entsymaattisesti ksylanaaseilla (K.E.L. Eriksson, Wood Science and Technology, 24, 1990, sivut 79-101; M.G. Paice et al., Biotechnol. and Bioeng., 32, 1988, sivut 235-239; ja J.C. Pommier et al., Tappi Journal, 1989, sivut 187-191).

On havaittu, että sellulaasivalmistetta, jossa on runsaasti endoglukanaasi-aktiivisuutta, voidaan menestyksellä käyttää paperimassan käsittelyyn, varsinkin valkaisu-, jauhatus- tai siistausprosessissa tai massan suotautumisominaisuuksien parantamiseksi.

Tämä keksintö koskee siis runsaasti endoglukanaasia ja vähän tai ei lainkaan sellobiohydrolaasia sisältävän sellulaasivalmisteen käyttöä paperimassan käsittelyyn.

Tässä yhteydessä termillä "endoglukanaasi" tarkoitetaan sellulaasia, joka hyökkää selluloosakuitujen vähäkiteisiin amorfisiin kohtiin, minkä seurauksena kiteisyyttä ei juuri lainkaan menetetä.

Keksinnön mukaan on havaittu, että kun massaprosessissa käytetyn sellulaasivalmisteen endoglukanaasipitoisuus on korkea, massojen selluloosakuidut vahingoittuvat vähemmän kuin käytettäessä sellulaasivalmistetta, joka sisältää huomattavasti sellobiohydrolaasia. On siis edullista käyttää sellulaasivalmistetta, joka sisältää vähintään 50%, etenkin vähintään 90% endoglukanaasia (sellulaasiproteiinin kokonaispainosta laskettuna).

Monet endoglukanaasit ovat tunnettuja ja käyttökelpoisia tässä keksinnössä. Mikrobiendoglukanaaseja pidetään taloussyistä edullisina. Endoglukanaasin tulee olla aktiivinen ja vakaa massaprosessin olosuhteissa, etenkin pH-arvossa. Esimerkkejä sopivista endoglukanaasilähteistä ovat Aspergillus (etenkin A. niger), Trichoderma (etenkin T. viride, T. reesei ja T. koningii), Humicola (etenkin H. insolens, ks. US-patentti 4,435,307), Fusarium, eten-

kin Fusarium oxysporum, Myceliophthora, Phanerochaete, Penicillium, Geotricum ja alkalofilinen Bacillus (US-patentti 3,844,890). Sellulaasivalmisteeseen sisältyvä endoglukanaasi on edullisesti yksikomponenttinen endoglukanaasi, ja edullisemmin sellainen, joka sisältää selluloosaa sitovan alueen.

Erityisen edullinen endoglukanaasi käytettäväksi tässä keksinnössä on endoglukanaasi, joka on immunoreaktiivinen vasta-aineen kanssa, joka on kehitetty Humicola insolens:ista, DSM 1800, johdettua, erittäin puhdasta 43 kD endoglukanaasia vastaan. Esimeriksi tällainen endoglukanaasi voi sisältää aminohapposekvenssin, joka on esitetty liitteenä olevassa sekvenssiluettelossa ID#1, tai sen homologin, jossa on endoglukanaasi-aktiivisuutta. Tässä yhteydessä termillä "homologinen" tarkoitetaan DNA:n koodaamaa polypeptidiä, joka hybridoi samaan koettimeen kuin DNA, joka koodaa edellä mainittuun endoglukanaasiin samoissa eritellyissä oloissa (kuten esikastelu 5xSSC:ssä ja esihybridointi 1 h 40°C:ssa liuoksessa, joka sisältää 20% formamidia, 5xDenhardtin liuosta, 50 mM natriumfosfaattia, pH 6,8, ja 50 μg denaturoitua vasikan kateenkorva-DNA:ta, jonka jälkeen hybridointi tehdään samassa liuoksessa, johon on lisätty 100 μM ATP:ta, 18 h 40°C:ssa). Tämän entsyymin eristystä ja käsittelyä on kuvattu tanskalaisessa patenttihakemuksessa nro 1159/90.

Tätä keksintöä voidaan käyttää kaikenlaisiin massoihin edistämään niiden valkaisua, jauhatusta tai siistausta, tai parantamaan niiden suotautumisominaisuuksia. Tämä on erityisen kiinnostavaa etenkin sellaisten massojen kohdalla, joiden SR-arvo on yli 25, ja varsinkin keitettäessä uudelleen jo aiemmin keitettyä ja kuivattua materiaalia, kuten kuivattua ensiömassaa, kierrätyskuituja ja keräyspaperia. Muuntyyppiset massat, joita voidaan menestyksellä käsitellä sellulaasivalmisteella, ovat kraftmassa, sulfiittimassa tai termomekaaninen massa ja muut suursaantomassat.

Schopper-Riegler luku (SR) määritetään ISO-standardin 5267 (osan 1) mukaan homogeeniselle massalle, jonka sakeus on 2 g/l. Tunnetun massatilavuuden annetaan suotautua metalliseulan läpi suppiloon. Suppilossa on akselinsuuntainen reikä ja sivureikä. Sivureiän kautta valuvan suodoksen määrä mitataan Schopper-Riegler yksiköillä merkityllä mittalasilla.

Riippuen esimerkiksi kierrätysveden käytöstä prosessi voi olla hapan (esim. pH 4-7), jolloin on edullista käyttää Aspergillus, Phanerochaete, Penicillium, Geotricum tai Trichoderma -endoglukanaasia. Tai prosessin pH voi olla lähellä neutraalia (esim. pH 6,5-9), jolloin on edullista käyttää Humicola, Fusarium tai Myceliophthora -endoglukanaasia, tai emäksinen (ph > 9), jolloin Bacillus-endoglukanaasia pidetään edullisena.

Sopiva sellulaasiannos vastaa yleensä pH 6:n sellulaasiaktiivisuutta 100 - 10 000 EGU (seuraavan määrityksen mukaisesti) per kg kuivaa massaa. Jos massaprosessi on emäksinen (pH yli 7), sellulaasiannoksen tulee vastata pH 9:n sellulaasiaktiivisuutta 100 - 10 000 CEVU (seuraavan määrityksen mukaisesti) per kg kuivaa massaa.

Sellulaasiaktiivisuuden määritys (EGU): Substraattiliuos sisältää 34,0 g/l CMC:tä (Hercules 7 LFD) 0,1 M fosfaattipuskurissa, pH 6,0. Analysoitava entsyyminäyte liuotetaan samaan puskuriin. 10 ml substraattiliuosta ja 0,5 ml entsyymiliuosta sekoitetaan keskenään ja siirretään värähtelyviskosimetriin (esim. MIVI 3000, jota toimittaa Sofraser, Ranska), jonka lämpötila on säädetty 40°C:seen. Yksi endoglukanaasiyksikkö (EGU) vastaa sitä entsyymimäärää, joka näissä olosuhteissa laskee viskositeettiarvon puoleen entisestä.

Sellulaasiaktiivisuuden määritys (CEVU): Substraattiliuos sisältää 33,3 g/l CMC:tä (Hercules 7 LFD) Tris-puskurissa, pH 9,0. Analysoitava entsyyminäyte liuotetaan samaan

puskuriin. 10 ml substraattiliuosta ja 0,5 ml entsyymiliuosta sekoitetaan keskenään ja siirretään viskosimetriin (Haake VT 181, NV-anturi, 181 rpm), jonka lämpötila on säädetty 40°C:seen. Yksi sellulaasiviskositeettiyksikkö (CEVU) vastaa sitä entsyymimäärää, joka näissä olosuhteissa laskee viskositeettiarvon puoleen entisestä.

Kun sellulaasivalmistetta käytetään tämän keksinnön mukaisesti valmistettaessa massaa keräyspaperista, siistaus voidaan aikaansaada toteuttamalla keitto korkeassa pH:ssa (yli 9) siistauskemikaalien läsnäollessa (kuten natriumhydroksidi, natriumsilikaatti, vetyperoksidi ja pinta-aktiivinen aine), jonka jälkeen muste erotetaan (esim. flotaatiolla ja/tai huuhtelemalla). Keksinnön tämä suoritusmuoto on erityisen edullinen, koska sellulaasi/endoglukanaasi parantaa myös siistausta, kuten myös suotautumista. Siistauksessa käytetyssä korkeassa pH:ssa on edullista käyttää Humicola- tai emäksistä Bacillus-endoglukanaasia.

Massan keitto kestää yleensä 5-30 minuuttia ja keittoa voi seurata maserointi (ts. inkubointi sekoituksella tai ilman) entsyymitoiminnan jatkamiseksi. Lämpötila on koko käsittelyn aikana yleensä 15-80°C, tyypillisesti 30-50°C. Sellulaasin vaikutusaika on yhteensä (ts. keitto + maserointi, mikäli käytetään) yleensä 30-180 minuuttia.

Tämän keksinnön mukaan valmistettua massaa voidaan käyttää tavanomaiseen paperinvalmistukseen.

Keksintöä kuvataan tarkemmin seuraavassa esimerkissä, jonka tarkoitus ei ole millään muodoin rajata keksinnön laajuutta.

Esimerkki

43 kD Humicola-endoglukanaasin käyttö paperimassan käsittelyyn

43 kD endoglukanaasia, jonka elkuperä on Humicola insolens, DSM 1800, käytettiin monentyyppisten paperimassojen käsittelyyn tarkoituksena tutkia entsyymin vaikutusta massan suotautumiseen.

Koeolosuhteet olivat seuraavat:

Massat

1. Keräyspaperiseos, joka sisälsi 33% sanomalehtiä, 33% aikakauslehtiä ja 33% tietokonepaperia. Siistauskemikaaleilla ja ilman (WPC ja WP).
2. Kierrätettyjä pahvipakkauksia (RCC).
3. Valkaistu kraftmassa, valmistettu männystä (BK).
4. Valkaisematon termomekaaninen massa, valmistettu kuusesta (TMP).

Entsymaattinen käsittely

43 kD endoglukanaasi -valmiste laimennettiin väkevyyteen 7 CEVU/ml ja lisättiin kuhunkin yllä mainittuun massaan (50 g DS, sakeus 3%). Entsyymiannos oli 2400 CEVU/kg kuivaa massaa. Entsymaattinen käsittely toteutettiin pH:ssa 7,5 ja 40°C:en lämpötilassa hellävaroen sekoittaen 60 minuutin ajan. 30 minuutin kuluttua otettiin näyte reaktion etenemisen määrittämiseksi. 60 minuutin kuluttua massa laimennettiin 0,5%:n sakeuteen kylmällä vedellä (+4°C), jotta reaktio lakkaisi.

Märkien massojen suotautuminen määritettiin yllä kuvatulla tavalla antamalla kullekin oma Schopper-Riegler (SR) -luku. Suotatumisaika tyhjiössä (DT) määritettiin myös.

Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa.

	Keräyspaperi + kemikaaleja	
	Vertailu	Entsyymi
SR (3%)	61	55
Suotautumisaika (s)		
150 g/m^2	18,2	17
Massa g/m^2	65,6	66,4
Tilavuus cm^3/g	1,65	1,66
Katkeamispituus, m	3650	3970
Puhkaisuindeksi	2,19	2,47

	Keräyspaperi	
	Vertailu	Entsyymi
SR (3%)	59	51
Suotautumisaika (s)		
150 g/m^2	18,2	12,7
Massa g/m^2	68,0	67,9
Tilavuus cm^3/g	1,68	1,64
Katkeamispituus, m	3810	3970
Puhkaisuindeksi	2,25	2,33

	Kierrätettyjä pahvipakkauksia	
	Vertailu	Entsyymi
SR (3%)	45	33
Suotautumisaika (s)		
150 g/m^2	6,8	5,3
Massa g/m^2	70,2	67,3
Tilavuus cm^3/g	1,91	1,99
Katkeamispituus, m	3640	3530
Puhkaisuindeksi	2,25	2,22

	Kraft	
	Vertailu	Entsyymi
SR (3%)	42	31
Suotautumisaika (s)		
150 g/m^2	10,7	6
Massa g/m^2	67,5	69,1
Tilavuus cm^3/g	1,44	1,42
Katkeamispituus, m	7010	7190
Puhkaisuindeksi	5,14	4,96

	TMP	
	Vertailu	Entsyymi
SR (3%)	68	60
Suotautumisaika (s)		
150 g/m^2	13,8	11,3
Massa g/m^2	68,7	70,2
Tilavuus cm^3/g	2,13	2,04
Katkeamispituus, m	3630	3620
Puhkaisuindeksi	1,95	1,91

Vertailukokeet. Samat olosuhteet kuin entsyymikäsittelyssä, mutta entsyymiä ei lisätty.

Taulukosta näkyy, että 43 kD endoglukanaasi -käsittely aikaansaa huomattavaa SR-lukujen laskua ja parantaa merkittävästi paperinvalmistukseen käytettävien massojen suotautumista.

Eri massoista valmistettiin paperiarkkeja Rapid Köthen laitteella ja näiden arkkien lujuutta mitattiin eri tekijöiden suhteen (katkeamispituus mukaan lukien). Entsyymitoiminnan aiheuttamaa lujuusominaisuuksien heikkenemistä ei havaittu, kuten taulukoista ilmenee.

SEKVENSSILUETTELO

(1) YLEISTÄ

(i) HAKIJA: NOVO NORDISK A/S,

(ii) KEKSINNÖN NIMIKE:

(iii) SEKVENSSIEN MÄÄRÄ: 1

(iv) POSTIOSOITE:

(A): OSOITE: NOVO NORDISK A/S, Patenttiosasto

(B) KATU: Novo Alle

(C) KAUPUNKI: Bagsvaerd

(E) MAA: Tanska

(F) POSTINUMERO: DK-2880

(v) TIETOKONELLA LUETTAVA MUOTO:

(A) LEVYTYYPPI: Levyke

(B) TIETOKONE: IBM PC yhteensopiva

(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS

(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, versio #1.25

(vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:

(A) HAKEMUS NUMERO:

(B) JÄTTÖPÄIVÄ:

(C) LUOKITUS:

(viii) ASIAMIES/AGENTTITIEDOT:

(A) NIMI: Thalsoe-Madsen, Birgit

(ix) TELEYHTEYSTIEDOT:

(A) PUHELIN: +45 4444 8888

(B) TELEFAX: +45 4449 3256

(C) TELEX: 37304

(2) SEKVENSSIN NRO 1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 1060 perusparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksinkertainen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: Humicola insolens

(b) KANTA: DSM 1800

(ix) OMINAISUUS:

(A) NIMI/TUNNUS: mat_peptide

(B) SIJAINTI: 73...927

(ix) OMINAISUUS

(A) NIMI/TUNNUS: sig_peptide

(B) SIJAINTI: 10...72

(ix) OMINAISUUS

(A) NIMI/TUNNUS: CDS

(B) SIJAINTI: 10...927

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 1

```
GGATCCAAG ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CCG TCC GCC GTT GTG GCC          48
          Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala
          -21 -20                -15                 -10

GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AGG TCC ACC CGC TAC        96
Ala Leu Pro Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr
             -5                  1               5

TGG GAC TGC TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG       144
Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val
     10                  15                  20

AAC CAG CCT GTC TTT TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT ATC ACG GAC       192
Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp
 25                  30                  35                  40

TTC GAC GCC AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC       240
Phe Asp Ala Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys
                 45                  50                  55

GCC GAC CAG ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG CTC GGT TTT       288
Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe
             60                  65                  70
```

```
GCT GCC ACC TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC        336
Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala
         75                  80                  85

TGC TAC GAG CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG        384
Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met
     90                  95                 100

GTC GTC CAG TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC        432
Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe
105                 110                 115                 120

GAT CTC AAC ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT        480
Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr
                125                 130                 135

CCC CAG TTC GGC GGT CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC        528
Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser
            140                 145                 150

CGC AAC GAG TGC GAT CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC        576
Arg Asn Glu Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr
        155                 160                 165

TGG CGC TTC GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAT CCG AGC TTC AGC TTC        624
Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe
    170                 175                 180

CGT CAG GTC CAG TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC        672
Arg Gln Val Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg
185                 190                 195                 200

CGC AAC GAC GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC        720
Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser
                205                 210                 215

ACC AGC TCT CCG GTC AAC CAG CCT ACC AGC ACC AGC ACC ACG TCC ACC        768
Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr
            220                 225                 230

TCC ACC ACC TCG AGC CCG CCA GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC        816
Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys
        235                 240                 245

ACT GCT GAG AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC        864
Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys
    250                 255                 260

ACC ACC TGC GTC GCT GGC AGC ACT TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC        912
Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr
265                 270                 275                 280

CAT CAG TGC CTG TAGACGCAGG GCAGCTTGAG GGCCTTACTG GTGGCCGCAA            964
His Gln Cys Leu
            285

CGAAATGACA CTCCCAATCA CTGTATTAGT TCTTGTACAT AATTTCGTCA TCCCTCCAGG    1024

GATTGTCACA TAAATGCAAT GAGGAACAAT GAGTAC                              1060
```

Patenttivaatimukset

1. Sellulaasivalmisteen käyttö paperimassan käsittelyyn, **tunnettu** siitä, että valmiste käsittää yksikomponenttisen endoglukanaasin, joka on peräisin Aspergillus-, Phanerochaete-, Penicillium-, Geotricum-, Trichoderma-, Humicola-, Fusarium- tai Myceliophthora-kannasta, ja vähän tai ei lainkaan sellobiohydrolaasia, edellyttäen, että käyttö ei ole massan vedenpoisto-ominaisuuksien parantamista käsittelemällä paperimassaa endokluganaasientsyymillä, jolla on oheisessa sekvenssilistauksessa numerolla 1 esitetty aminohapposekvenssi tai sen homologi, jolla on endokluganaasiaktiivisuutta pH:ssa 6,0-10,0 ja joka on immunoreaktiivinen vasta-aineen kanssa, joka on kehitetty Humicola insolens kannasta DSM 1800 peräisin olevaa, hyvin puhdasta ~43 kD endoglukanaasia vastaan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että endoglukanaasissa on selluloosaa sitova alue.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että sellulaasivalmiste sisältää vähintään 50 % (painoprosenttia sellulaasiproteiinin kokonaismäärästä) endoglukanaasia.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että sellulaasivalmiste sisältää vähintään 90 % (painoprosenttia sellulaasiproteiinin kokonaismäärästä) endoglukanaasia.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että endoglukanaasin pH-optimi on pH 4-7, ja se on peräisin Aspergillus-, Phanerochaete-, Penicillium-, Geotricum- tai Trichoderma-kannasta.

6. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että endoglukanaasin pH-optimi on pH

6,5-9, ja se on peräisin Humicola-, Fusarium- tai Myceliophthora-kannasta.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että endoglukanaasi on immunoreaktiivinen vasta-aineen kanssa, joka on kehitetty Humicola insolens -kannasta DSM 1800 peräisin olevaa, hyvin puhdasta ~43 kD:n endoglukanaasia vastaan.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että endoglukanaasilla on aminohapposekvenssi, kuten on esitetty oheisessa sekvenssilistauksessa numerolla 1, tai sen homologi, joka omaa endoglukanaasi-aktiivisuutta.

Patentkrav

1. Användning av en cellulaspreparation för behandling av pappersmassa, **kännetecknad** av att preparationen innefattar ett enkomponentendoglukanas härrörande från en stam av Aspergillus, Phanerochaete, Penicillium, Geotricum, Trichoderma, Humicola, Fusarium eller Myceliophthora, samt ringa eller inget cellobiohydrolas, med det förbehållet att användningen inte är avsedd för förbättring av avvattningsegenskaperna för massa genom behandling av pappersmassa med ett endoglukanasenzym ett endoglukanas med den aminosyrasekvens som visas i bifogad Sekvenslista ID# 1, eller en homolog därav som uppvisar endoglukanasaktivitet mellan pH 6,0 och 10,0 och som är immunoreaktiv med en antikropp bildad mot ett höggradigt renat ~43 kD endoglukanas härrörande från Humicola insolens, DSM 1800.

2. Användning enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att endoglukanaset innefattar ett cellulosabindande område.

3. Användning enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknad** av att cellulaspreparationen innehåller åtminstone 50 % (baserat på vikten av det totala cellulasproteininnehållet) endoglukanas.

4. Användning enligt patentkrav 3, **kännetecknad** av att cellulaspreparationen innehåller åtminstone 90 % (baserat på vikten av det totala cellulasproteininnehållet) endoglukanas.

5. Användning enligt något av patentkraven 1-4, **kännetecknad** av att endoglukanaset har ett pH-optimum vid pH 4-7 och härrör från en stam av Aspergillus, Phanerochaete, Penicillium, Geotricum eller Trichoderma.

6. Användning enligt något av patentkraven 1-4, **kännetecknad** av att endoglukanaset har ett pH-optimum vid pH 6,5-9 och härrör från en stam av Humicola, Fusarium eller Myceliophthora.

7. Användning enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att endoglukanaset är immunoreaktivt med en antikropp bildad mot ett höggradigt renat 43 kD endoglukanas härrörande från Humicola insolens, DSM 1800.

8. Användning enligt patentkrav 7, **kännetecknad** av att endoglukanaset har den aminosyrasekvens som visas i den bifogade Sekvenslistan ID# 1, eller en homolog därav som uppvisar endoglukanasaktivitet.