

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 932651 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **932651**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁵)

C12N 9/54

C12N 1/20

C11D 3/386

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **10.06.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **10.06.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **12.12.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

11.06.1992 DE 4219104

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Solvay Enzymes GmbH & Co KG, Grosse Drakenburger Strasse 93-97, 31564 Nieburg (Weser), SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Vetter, Roman, Burgdorf, SAKSA, (DE)

2 • Möller, Bernhard, BRD, SAKSA, (DE)

3 • Preen, Klaus, BRD, SAKSA, (DE)

4 • Mücke, Ingo, Germany, SAKSA, (DE)

5 • Konieczny-Janda, Gerhard, Pattensen, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Bacillus sp. MF12:sta saatavat alkaliset proteaasit, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö

Alkaliska proteaser ur Bacillus sp. MF12, förfarande för deras framställning och deras användning

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

6845 DSM

Bacillus sp. MF12-kannasta saatava alkalinen proteaasi, menetelmä sen valmistamiseksi ja sen käyttö

Alkalisk proteas ur Bacillus sp. MF12, förfarande för dess framställning och dess användning

Oheisen keksinnön kohteena on Bacillus sp. MF12-kannasta saatava alkalinen proteaasi, sen käyttö sekä menetelmä tämän proteaasin valmistamiseksi.

Alkaliset proteaasit ovat arvokkaita teollisia tuotteita, joilla on edullisia sovellutuksia, erityisesti pesuaineteollisuudessa, koska niiden avulla voidaan poistaa proteiinipitoisia likoja. Jotta nämä proteaasit olisivat vaikutuskykyisiä, niin niillä ei ole ainoastaan oltava proteolyyttistä aktiivisuutta pesuolosuhteissa (pH-arvo, lämpötila), vaan niiden on myös sovittava yhteen pesuaineen muiden komponenttien kanssa, eli niitä on voitava käyttää yhdistelminä muiden entsyymien, tensidien, runkoaineiden (builder), valkaisuaineiden, valkaisuaineaktivaattoreiden sekä muiden lisä- ja apuaineiden kanssa. Näiden proteaasien on erityisesti oltava riittävän stabiileja näiden muiden pesuainekomponenttien vaikutusta vastaan ja niiden pesutehon on oltava riittävä näiden muiden komponenttien läsnäollessa.

Alkalisia proteaaseja on tähän saakka saatu tekniikan nykytason mukaisesti erityisesti viljelemällä Bacillus-lajeja, joista esimerkkeinä voidaan mainita Bacillus alcalophilus, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens ja Bacillus licheniformis, ja jotka tuottavat alkalisia proteaaseja niitä viljelyalustaan erittäen.

Alalla on jo tehty tällaisiin alkalisiin proteaaseihin liittyen lukuisia yrityksiä saada uusia alkalisia proteaaseja, joilla on toivottuja ominaisuuksia. Tästä huolimatta alalla esiintyy tarvetta löytää uusia alkalisia proteaaseja, joilla on erityisesti pesukäyttötymistä ajatellen edullisia ominaisuuksia.

Näin ollen keksinnön tehtävänä oli valmistaa uusi arvokas alkalinen proteaasi, jolla on edullisia ominaisuuksia.

Keksinnön puitteissa todettiin nyt yllättäen, että alkalisella Bacillus-proteaasilla, joka on saatavissa viljelemällä Bacillus sp. MF12 DSM 6845-kantaa, on edullisia ominaisuuksia ja sen pesuvaikutus on erittäin hyvä.

Näin ollen keksinnön kohteena on alkalinen Bacillus-proteaasi, jonka pH-optimi on pH-alueella 9,5-13,0, ja jonka lämpötilaoptimi on noin alueella 55-65 °C, ja joka on saatavissa viljelemällä Bacillus sp. MF12 DSM 6845-kantaa.

Keksinnön piiriin kuuluu tällöin Bacillus sp. MF12 DSM 6845-kannasta saatava alkalinen proteaasi, jolla on seuraavat ominaisuudet:

- (1) vaikutus: se pilkkoo proteiineja ja peptidejä;
- (2) pH-optimi: noin pH-alueella 9,5-13,0;
- (3) pH-stabiilisuus: tämä proteaasi on täysin stabiili pH-alueella 9,5-11,0;
- (4) lämpötilaoptimi: noin 64 °C;
- (5) lämpötilastabiilisuus: proteaasin inkubointi korkeintaan 30 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan ei heikennä olennaisesti sen aktiivisuutta; sen jälkeen, kun proteaasia on inkuboitu 15 minuutin ajan noin 40 °C:ssa, sen jäännösaktiivisuus on vähintään 75 %.

Keksinnön mukaiset Bacillus-proteaasit soveltuvat lisäaineiksi pesu- ja puhdistusainekoostumuksiin ja muihin vastaaviin, joilla on neutraali tai alkalinen pH-arvo, ja joita on tarkoitus käyttää matalissa lämpötiloissa, erityisesti korkeintaan 60 °C olevissa lämpötiloissa. Näin ollen keksinnön kohteena on myös keksinnön mukaisen alkalisen Bacillus-proteaasin käyttö pesuaine-, puhdistusaine- tai astianpesuainekoostumuksissa. Tällöin sitä voidaan myös käyttää edullisesti muiden tavallisten entsyymien, erityisesti myös muiden proteaasien läsnäollessa. Keksinnön mukaisen alkalisen proteaasin eräänä eri-

tyisen edullisena käyttösovellutuksena on sen käyttö pesuaine-, puhdistusaine- tai astianpesuainekoostumuksissa, joita on tarkoitus käyttää matalissa, korkeintaan 60 °C olevissa lämpötilassa.

Keksinnön muuna kohteena ovat pesuaine- ja puhdistusainekoostumukset, kuten esimerkiksi tekstiilien tai astioiden puhdistusaineet, jotka sisältävät keksinnön mukaista alkalista proteaasia. Näitä sovellutuksia varten keksinnössä saadaan aikaan uusi alkalinen proteaasi, jonka edulliset pesutulokseen vaikuttavat ominaisuudet pääsevät edullisella tavalla täyteen oikeuteensa edellä mainituissa koostumuksissa. Keksinnön mukaista proteaasia voidaan käyttää pesu- ja puhdistusainekoostumuksissa, esimerkiksi nestemäisissä tai jauhemaisissa pesuainekoostumuksissa joko yksinään tai mahdollisesti myös yhdessä tekniikan nykytason mukaisten pesu- ja puhdistusaineproteaasien tai muiden, tällaisissa koostumuksissa tavallisten entsyymien kuten esimerkiksi proteaasien, amylaasien, lipaasien, pektinaasien, nukleaaasien, oksidoreduktaasien, sellulaasien ja muiden vastaavien kanssa. Keksinnön mukaista proteaasia käytetään tällaisissa pesu- ja puhdistusainekoostumuksissa pesuaine-entsyymeille sinänsä tavanomaisina määrinä, edullisesti korkeintaan 3 paino-% olevana määränä (kokonaiskoostumuksen kuiva-aineesta laskien), edullisesti alueella 0,2-1,5 paino-% olevana määränä.

Keksinnön mukaiset pesu- ja puhdistusaineet voivat sisältää näiden mainittujen pesuaine-entsyymien lisäksi myös kaikkia muita tekniikan nykytason mukaisia, sinänsä tavallisia pesuainekomponentteja kuten tensidejä, valkaisuaineita tai runkoaineita (builder), sekä muita tavallisia, pesuaineiden muodostamiseksi käytettyjä apuaineita sinänsä tavallisina määrinä. Tällaisia apuaineita ovat esimerkiksi tehosteet, entsyymistabilisaattorit, liankantajat ja/tai yhteensopivuutta parantavat aineet, kompleksien ja kelaattien muodostajat, saippuavaahtoa säätelevät aineet sekä sellaiset lisäaineet kuten optiset kirkasteet, sameutta lisäävät aineet, korroosionestoaineet, staattista sähköisyyttä vähentävät aineet, väriaineet, bakte-

risidit, valkaisuaineaktivaattorit, perhappovalkaisuaineiden esiasteet.

Niinpä keksinnön mukaiset pesuainekoostumukset sisältävät tyypillisen, esimerkkinä esitetyn suoritusmuodon mukaisesti, kuiva-aineesta laskien:

- a) vähintään 5 paino-%, esim. 10-50 paino-% jotakin tensidiä tai tensidiseosta;
- b) korkeintaan 40 paino-% runkoainetta tai runkoaineseosta;
- c) korkeintaan 40 paino-% valkaisuainetta tai valkaisuaineseosta, edullisesti perboraattia kuten natriumperboraatti-tetrahydraattia tai natriumperboraatti-monohydraattia,
- d) korkeintaan 3 paino-% vähintään yhtä keksinnön mukaista proteaasia;
- e) muita aineosia kuten apuaineita niin paljon, että saadaan 100 %.

Tällaiset pesuainekoostumukset voidaan valmistaa sinänsä tavallisella tavalla. Tällöin keksinnön mukaiset proteaasit voidaan sekoittaa sinänsä tunnetulla tavalla esimerkiksi rakeina, kokkareina tai pelletteinä, jotka on mahdollisesti varustettu pinnoitteella, pesuainekoostumuksen muihin komponentteihin.

Keksinnön mukainen proteaasi soveltuu tämän lisäksi myös hyvin sinänsä tavallisiin nestemäisiin pesuainevalmisteisiin.

Keksinnön kohteena on edelleen menetelmä keksinnön mukaisen alkalisen proteaasin valmistamiseksi. Niinpä keksinnön mukaista alkalista proteaasia saadaan siten, että talletusnumerolla DSM 6845 talletettua Bacillus sp. MF12-kantaa viljellään ja tämän jälkeen viljelmän supernatantista eristetään muodostunut alkalinen proteaasi. Proteaasi eristetään viljelmän supernatantista tällöin siten, että bakteerisolut erotetaan ensin sentrifugoimalla tai suodattamalla. Proteaasia voidaan vielä mahdollisesti väkevöidä ja puhdistaa edelleen jäljellä olevasta viljelmän supernatantista kalvosuodatuksella tai saostuksella.

Keksinnön mukaisen Bacillus sp. MF12-proteaasin tunnusomaisena piirteenä ovat sen edulliset ominaisuudet. Sen stabiilisuus on hyvä alkalisisissa pH-arvoissa. Keksinnön mukaisen proteaasin pH-optimi on pesu- ja puhdistusainekoostumuksien käytön kannalta edullisella alueella. Edelleen keksinnön mukaisen proteaasin lämpötilaoptimi on noin alueella 55-65 °C. Lisäksi niiden stabiilisuus on myös hyvä pesuliuoksessa. Sen ansiosta, että keksinnön mukaisen Bacillus-proteaasin aktiivisuus on edullinen korkeintaan 65 °C olevassa lämpötilassa, sitä voidaan käyttää erityisesti sellaisissa puhdistus- ja pesuainekoostumuksissa, joita on tarkoitus käyttää matalissa lämpötiloissa, erityisesti korkeintaan 60 °C olevassa lämpötilassa. Keksinnön mukaista proteaasia sisältävien pesu- ja puhdistusainekoostumusten pesuteho on edullinen proteiinipitoisten likojen poistamista ajatellen. Erityisen edullista on se, että kudoksesta saadaan poistetuksi keksinnön mukaisen proteaasin avulla myös erityyppisiä proteiinilikoja pesutoimenpiteen aikana.

Seuraavassa kuvataan keksinnön havainnollistamiseksi esimerkkejä sen erilaisista tyypillisistä suoritustavoista, joilla ei pyritä kuitenkaan rajoittamaan keksintöä millään tavalla.

Seuraavissa esimerkeissä entsyymistabiilisuus on ilmoitettu siten, että "täysin stabiili" tarkoittaa sitä, että jäännösaktiivisuus on vähintään 90 %; ja "stabiili" tarkoittaa sitä, että jäännösaktiivisuus on vähintään 80 %.

Ohessa käytetty, esimerkissä 1 ja keksinnön selityksessä kuvattu Bacillus sp. MF12-kanta on eristetty luonnosta ja se on talletettu 16.12.1991 kantakokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) talletusnumerolla DSM 6845.

Kuvio 1 esittää Bacillus sp. MF12-kannasta (DSMZ 6845) saadun proteaasin lämpötilaoptimia.

Kuvio 2 esittää Bacillus sp. MF12-kannasta (DSMZ 6845) saadun proteaasin lämpötilastabiilisuutta.

Kuvio 3 esittää Bacillus sp. MF12-kannasta (DSM 6845) saadun proteaasin pH-optimia.

Kuvio 4 esittää Bacillus sp. MF12-kannasta (DSM 6845) saadun proteaasin pH-stabiilisuutta. pH-arvon säätämiseen käytettiin pH-alueella 5-7 0,1 M fosfaattipuskuria, pH-alueella 7-9 0,1 M Tris-HCl-puskuria ja pH-alueella 9-12,1 0,2 M glysiini-NaOH-puskuria.

Esimerkki 1

Bacillus sp. MF12-organismin eristäminen luonnosta ja sen tunnistaminen

Bacillus sp. MF12-kanta eristettiin luonnosta ja se talletettiin kantakokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen talletusnumerolla DSM 6845.

Kysymyksessä on Bacillus-sukuun kuuluva gram-positiivinen, itiöitä muodostava, valinnaisesti aerobi mikro-organismi. Seuraavassa kuvataan solu- ja pesäkemorfologiset ominaisuudet, biokemialliset reaktiot ja reaktiot tiettyihin kasvuolosuhteisiin on esitetty taulukossa 1.

Bacillus sp. MF12 DSM 6845:

Kulmistaan pyöristetyn sauvan muotoinen bakteeri. Gram-reaktio (L-aminopeptidaasikoe, KOH-koe) on positiivinen. P8A-agarilla (katso alla) 37 °C:ssa kasvatettaessa pesäkkeiden läpimitta on 2-3 mm 42 tunnin kuluttua, ne ovat väriltään kellertävän-vaaleanruskeita, läpinäkyvättömiä, laakeita, pyöreitä tai epäsäännöllisiä ja niiden reuna on rosainen. Pesäkkeiden läpimitta LB/CO₂-agarilla on 6-10 mm ja ne ovat väriltään kellertävän-vaaleanruskeita, läpinäkyvättömiä, laakeita, pyöreitä tai epäsäännöllisiä ja niiden reuna on rosainen. Kun soluja on kasvatettu 22 tunnin ajan P8A-ravinneliuksessa 37 °C:n lämpötilassa ja nopeudella 120 kierr./min. niiden koko on 0,76-0,95 µm x 1,9-3,8 µm. Itiöt ovat soikeita ja sporangium on turvonnut.

LB-CO₃-agar:

Hiivauute	10 g
Tryptoni	5 g
NaCl	5 g
Karbonaattipuskuri	50 ml
Agar	20 g
Kahdesti tislattu vesi	
siten, että tilavuudeksi saadaan	1000 ml
pH	9,5

Karbonaattipuskuri:

Na ₂ CO ₃	53 g
NaHCO ₃	42 g
Kahdesti tislattu vesi	
siten, että tilavuudeksi saadaan	1000 ml

Rasvatonta maitoa sisältävä liuos:

Rasvaton maito	100 g
Kahdesti tislattu vesi	
siten, että tilavuudeksi saadaan	1000 ml

P8A-agar:

Agar	20 g
P8A-ravinneliuos	
siten, että tilavuudeksi saadaan	1000 ml

P8A-ravinneliuos:

Nutrient Broth	8 g
KCl	1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1 mg
FeCl ₃	8 mg
Rasvatonta maitoa sis. liuos	100 ml
Karbonaattipuskuri	50 ml
Kahdesti tislattu vesi	
siten, että tilavuudeksi saadaan	1000 ml

Taulukossa 1 mainitut kokeet toteutettiin teoksen Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, 1121-1125, P.H.A. Sneath (toim.), Williams ja Wilkins, Baltimore-Lontoo-Los Angeles-Sydney, 1986, mukaisesti.

Täsmällinen luokitus Bacillus-lajiksi ei ollut mahdollista. Kyseessä olevasta kannasta alettiin käyttää merkintää Bacillus sp. MF12.

Taulukko 1

Bacillus sp. MF12 (DSM 6845)-kannan tunnusomaisia piirteitä

Ominaisuus	MF12

Solun halkaisija >1 µm	-
Pyöreä itiömuoto	-
Turvonnut sporangium	+
Parasporaaliset kiteet	-
Katalaasi	+
Anaerobinen kasvu	+
Voges-Proskauer-koe	-
pH V-P-ravintoliuoksessa	
<6	-
>7	+
Hapon muodostuminen johtuen	
glukoosista	+
L-arabinoosista	+
D-ksyloosista	+
D-mannitolista	+
Kaasun muodostuminen	
glukoosin läsnäollessa	-
Kaseiinin hydrolyysi	+
Gelatiinin hydrolyysi	+
Tärkkelyksen hydrolyysi	+
Sitraatin metaboloituminen	-
Propionaatin metaboloituminen	-
Tyrosiinin hajoaminen	-

Amiinin poisto fenyyli- alaniinista	+
Munankeltuainen-lesitinaasi	+
Nitraatin pelkistyminen nitriitiksi	+
Indolin muodostuminen	-
Dihydroksiasetonin muodostuminen	+
NaCl- ja KCl-tarve	e. m.
Allantoiini- tai ureaattitarve	e. m.
Kasvu, kun RL:n pH on	
6, 8	-
5, 7	-
Kasvu NaCl-liuoksessa	
2 %	e. m.
5 %	+
7 %	+
10 %	+
Kasvu	
5 °C:ssa	-
10 °C	e. m.
30 °C	+
40 °C	e. m.
50 °C	e. m.
55 °C	e. m.
65 °C	e. m.
Kasvu lysotsyymin läsnäollessa	+
Autotrofi seoksen H ₂ + CO ₂ tai CO:n läsnäollessa	e. m.

Ominaisuudet määritetty tavalla, joka on kuvattu teoksessa
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, s. 1123,
P.H.A. Sneath (toim.), Williams ja Wilkins, Baltimore-Lontoo-
Los Angeles-Sydney, 1986.

- + Positiivisia oli 90 % tai enemmän.
- Negatiivisia oli 90 % tai enemmän.
- d Positiivisia oli 11-89 %.
- e. m. ei määritetty.
- RL ravintoliuos.

Esimerkki 2

Bacillus sp. MF12-kannasta DSM 6845 saatavan alkalisen proteaasin valmistus

50 ml:aan Luria-elatusalustaa, pH 9,5 (10 g hiivauutetta, 5 g tryptonia, 5 g NaCl ja 50 ml karbonaattipuskuria sekä kahdesti tislattua vettä siten, että kokonaistilavuudeksi saatiin 1000 ml), joka oli laitettu 3 virtauksenestolevyä käsittävään 500 ml:n erlenmeyeriin, siirrostettiin Bacillus sp. MF12-kannan yksittäinen pesäke (kantaa oli kasvatettu P8A-agarmaljoilla), ja tätä viljelmää inkuboitiin 16 tuntia 37 °C:n lämpötilassa, nopeudella 240 kierr./min. sekoittaen. Tästä viljelmästä siirrostettiin 2,5 ml 50 ml:aan varsinaista viljelyalustaa [soija 2 %; tärkkelys 5 %, maissin liotusvesi 1 %; karbonaattipuskuri 50 ml (Na_2CO_3 , 4,2 %)], joka oli 3 virtauksenestolevyä käsittävässä 500 ml:n erlenmeyerissä, ja tätä viljelmää inkuboitiin 48 tunnin ajan 37 °C:ssa, nopeudella 240 kierr./min. sekoittaen. Näiden 48 tunnin kuluttua proteolyyttinen aktiivisuus viljelmän supernatantissa, joka oli saatu sentrifugoimalla 15 minuuttia nopeudella 27 000 x g, oli 5000 Delft-yksikköä/ml ("Delft-yksikkö" on määritelty esimerkissä 3).

Esimerkki 3

Bacillus sp. MF12-proteaasin entsyymaattisten ominaisuuksien määrittäminen

Proteaasin aktiivisuus määritettiin Delft Units-yksikköinä (DU). 1000 DU on se proteolyyttinen aktiivisuus, joka tuottaa 1 ml:n tilavuudessa 2 %:sta (paino/paino) entsyymiliuosta kaseiinin hajoamisen jälkeen ekstinktioeroksi 0,4000 (1 cm:n pituinen valoreitti; 275 nm; määritetty sokeakoetta vastaan).

Entsyymaattisten ominaisuuksien kuten lämpötilaoptimin, lämpötilastabiilisuuden, pH-optimin ja pH-stabiilisuuden määrittämiseen käytettiin esimerkissä 2 kantaa Bacillus sp. MF12 DSM 6845 viljelemällä saatujen viljelmien supernatantteja.

Näissä viljelmän supernatanteissa läsnäolevien proteaasien lämpötilaoptimi määritettiin alueella 40-72 °C. Tulokset on esitetty taulukossa 2 sekä kuviossa 1.

Bacillus sp. MF12-kannasta DSM 6845 saadun proteaasin lämpötilaoptimi on 64 °C.

Taulukko 2

Bacillus sp. MF12-kannasta DSM 6845 saadun alkalisen proteaasin lämpötilaoptimi

Aktiivisuuden (%) riippuvuus lämpötilasta (°C)					
40°C	50°C	55°C	60°C	64°C	72°C
18 %	37 %	53 %	74 %	100 %	76 %

Lämpötilastabiilisuuden määrittämiseksi proteaasipitoista supernatanttia inkuboitiin 15 minuutin ajan eri lämpötiloissa ja tämän jälkeen määritettiin jäännösaktiivisuus. Tulokset on esitetty taulukossa 3 sekä kuviossa 2.

Bacillus sp. MF12-kannasta DSM 6845 saatu proteaasi on stabiili 31 °C:n lämpötilaan saakka (jäännösaktiivisuus >90 %) ja sen jäännösaktiivisuudeksi saatiin vielä 58 % sen jälkeen, kun sitä oli inkuboitu 15 minuutin ajan 50 °C:n lämpötilassa.

Taulukko 3

Proteolyyttinen jäännösaktiivisuus prosentteina 15 minuuttia eri lämpötiloissa toteutetun inkuboinnin jälkeen

Lämpötila (°C)	Jäännösaktiivisuus
4	100
20	98
31	92
40	79
50	58
60	25

Bacillus sp. MF12-kannasta DSM 6845 saadun proteaasin pH-optimin määrittämiseksi aktiivisuus mitattiin eri pH-arvoissa. pH-arvon säätämiseen käytettiin pH-alueella 5,0-7,0 fosfaattipuskuria (0,1 M), pH-alueella 7,0-9,0 Tris-HCl-puskuria (0,1 M) ja pH-alueella 9,0-13,0 glysiini-NaOH-puskuria (0,1 M). Tästä aktiivisuusmäärityksestä saadut arvot on esitetty ja kuviossa 3.

Bacillus sp. MF12-kannasta DSM 6845 saadun alkalisen proteaasin pH-optimi on 12. pH-arvossa 13 aktiivisuus on vielä >90 %.

pH-stabiilisuuden tutkimiseksi Bacillus sp. MF12-kannan proteaasia inkuboitiin 24 tunnin ajan 4 °C:n lämpötilassa puskureissa, joiden pH-arvo vaihteli. Tämän jälkeen määritettiin proteaasin jäännösaktiivisuus. pH-alueella 5-7,1 käytettiin fosfaattipuskuria (0,1 M), pH-alueella 7,5-9,0 käytettiin Tris-HCl-puskuria [Tris(hydroksimetyyli)aminometaani-puskuri] (0,1 M) ja pH-alueella 9,0-12,1 käytettiin glysiini-natriumhydroksidipuskuria (0,1 M). Saatu tulos on esitetty kuviossa 4.

Bacillus sp. MF12-kannasta DSM 6845 saadun entsyymin jäännösaktiivisuus on vähintään 70 % 24 tuntia kestäneen inkuboinnin jälkeen tällä koko pH-alueella, ja se on pH-arvossa 11 täysin stabiilia.

Esimerkki 4

Bacillus sp. MF12-kannasta (DSM 6845) saadun proteaasin pesuteho

Keksinnön mukaisen proteaasin MF12 pesuvaikutus selvitettiin pesukokeissa.

Esimerkki 4a

Keksinnön mukaisen proteaasin käyttämiseksi pesuaineissa sen pesuteho määritettiin pesukokeissa käyttäen EY-PC-koekudosta (munankeltuainen/vesiväri-lika polyesteri-puuvilla-sekoitekan-kaalla, oma valmiste) laboratoriopesukoneissa (tyyppi: Polycolor). Tätä tarkoitusta varten koekudos pestiin pesuaineperusvalmisteella, jota käytettiin 6 g/l, ja jonka koostumus oli 18,4 % zeoliittia, 7,3 % Na_2CO_3 , 4,8 % lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia, 3,3 % ei-ionisia aineita, 3,3 % saippuaa, 0,1 % vaahdonestoainetta, 1,5 % karboksimeetyyliselluloosaa, 0,15 % optisia kirkasteita, 3,8 % natrium-di-silikaattia, 25 % perboraattia, 1,5 % TAED ja 30,85 % Na_2SO_4 , ja johon lisättiin tutkittavaa proteaasia (5000 DU/litra) vedessä, jonka kovuus oli 15 °dH. Pesuliuoksen pH oli 10,3. Pesu tapahtui lämpötila-alueella 15-60 °C 45 minuutin ajan (2 °C/min; pitoaika 22,5 min.). Entsyymipitoinen pesuaineliuos vaikutti koekudokseen pyörivässä näyteastiassa, jonka lämpötilaa säädettiin vesihau-teen avulla edellä mainitun lämpötilaohjelman mukaisesti. Pesu- vaiheen jälkeen koekudos huuhdottiin kahdesti vesijohtovedellä ja sitten se silitettiin.

Pesuteho määritettiin mittaamalla pestyn koekudoksen heijas- tus. Vertailun vuoksi mitattiin myös kuivan, pelkällä pesuai- nekoostumuksella pestyn koekudoksen heijastus.

Keksinnön mukaista proteaasia lisäämällä heijastukseksi saa- tiin 41,2, ja kun pesuaineperusvalmisteeseen lisättiin keksin- nön mukaista proteaasia, niin koekudoksen heijastuskyvylle saatiin arvoksi 51,9.

Esimerkki 4b

Proteaasin MF12 pesuteho määritettiin esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. Koekudoksena käytettiin kuitenkin verellä, maidolla ja vesivärillä liattua polyesteri-puuvilla-sekoitekangasta

(EMPA 117 - saatu sveitsiläisestä aineenkoetuslaitoksesta Eidgenössische Materialprüfungsanstalt, St. Gallen, Sveitsi). Pesuainepesuvalmisteena käytettiin kaupallisesti saatavaa jauhemaista täyspesuainetta (pH 10,4).

Sen jälkeen, kun koekudos oli pesty entsyymipitoisella pesuaineliuoksella, sen heijastukseksi mitattiin 59,0. Mikäli koekudos pestiin pelkällä pesuaineperuskoostumuksella, niin sen heijastusarvoksi saatiin vain 35,1.

Esimerkki 4c

Proteaasin MF12 pesuteho määritettiin esimerkissä 4b kuvatulla tavalla. Koekudoksena käytettiin kuitenkin munankeltuaisella ja vesivärillä liattua polyesteri-puuvilla-sekoitekangasta.

Sen jälkeen, kun koekudos oli pesty entsyymipitoisella pesuaineliuoksella, sen heijastukseksi mitattiin 51,9. Mikäli koekudos pestiin pelkällä pesuaineperuskoostumuksella, niin sen heijastusarvoksi saatiin vain 41,3.

Kaikissa toteutetuissa pesukokeissa koekudokselle, joka pestiin lisäämällä keksinnön mukaista proteaasia pesuliuokseen, saatiin selvästi suurempi heijastusarvo kuin pelkällä pesuaineperuskoostumuksella pestylle koekudokselle. Tämä osoittaa keksinnön mukaisen proteaasin erittäin hyvän pesutehon, ja näissä kokeissa erilaiset proteiiniliat saatiin poistumaan kudoksesta vaikeuksitta pesuvaiheen aikana.

Patenttivaatimukset

1. Alkalinen Bacillus-proteaasi, t u n n e t t u siitä, että sen pH-optimi on noin pH-alueella 9,5-13,0 ja sen lämpötilaoptimi on noin alueella 55-65 °C, ja että se on saatavissa viljelemällä Bacillus sp. MF12 DSM 6845-kantaa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen alkalinen Bacillus-proteaasi, t u n n e t t u siitä, että sillä on seuraavat ominaisuudet:

- (1) vaikutus: se pilkkoo proteiineja ja peptidejä;
- (2) pH-optimi: noin pH-alueella 9,5-13,0;
- (3) pH-stabiilisuus: proteaasi on täysin stabiili pH-alueella 9,5-11,0;
- (4) lämpötilaoptimi: noin 64 °C;
- (5) lämpötilastabiilisuus: proteaasin inkubointi korkeintaan 30 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan ei heikennä olennaisesti sen aktiivisuutta; sen jälkeen, kun proteaasia on inkuboitu 15 minuutin ajan 40 °C:ssa, sen jäännösaktiivisuus on vähintään 75 %.

3. Koostumukset pesu-, puhdistus- tai astianpesusovellutuksia varten, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät jomman kumman patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaista alkalista Bacillus-proteaasia.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukaiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät alkalista Bacillus-proteaasia yhdessä yhden tai useamman, pesu- ja puhdistusaineissa tavallisen, proteaasien, lipaasien, pektinaatien, amylaasien, nukleaa-sien, oksidoreduktaasien ja sellulasien joukosta valittun entsyymin kanssa.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukaiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät alkalista Bacillus-proteaasia yhdessä toisen proteaasin kanssa.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 3-5 mukaiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät alkalista Bacillus-proteaasia valmisteessa, joka on tarkoitettu matalia, korkeintaan noin 60 °C olevia käyttölämpötiloja varten.

7. Menetelmä jomman kumman patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen alkalisen Bacillus-proteaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että tässä menetelmässä viljellään talletusnumerolla DSM 6845 talletettua Bacillus sp. MF12-kantaa, minkä jälkeen muodostunut alkalinen proteaasi eristetään viljelmän supernatantista.

8. Talletusnumerolla DSM 6845 talletettu Bacillus sp. MF12-kanta.

Fig.1

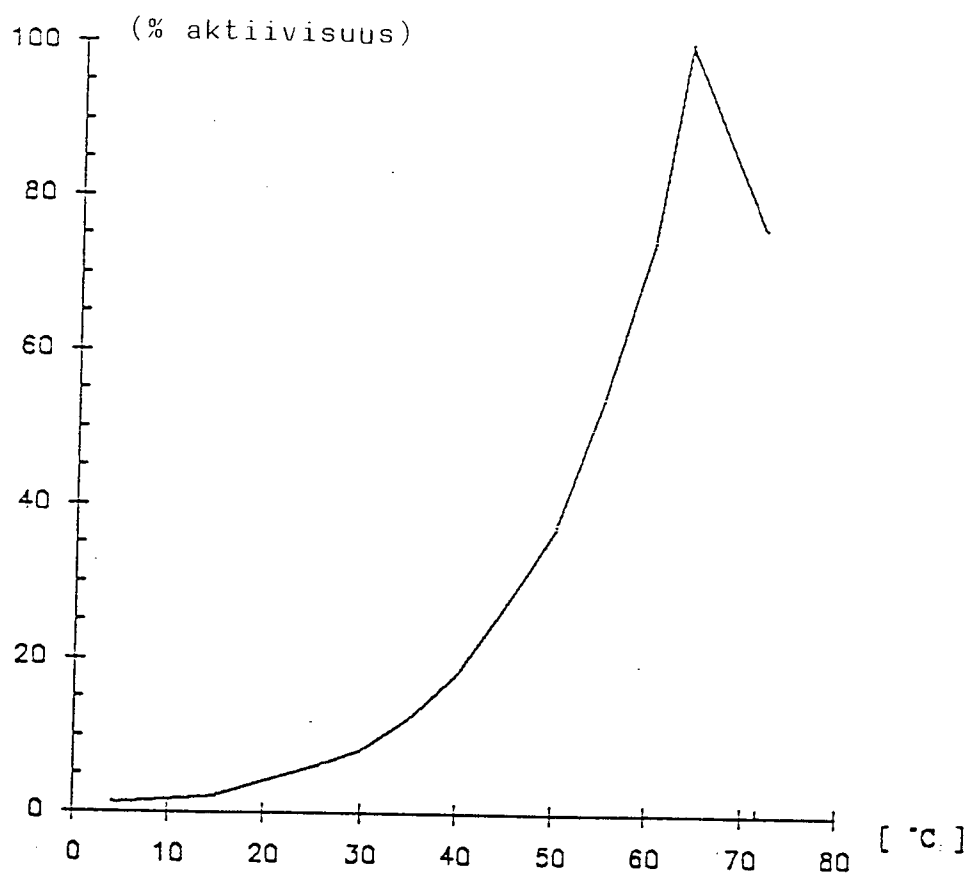


Fig.2

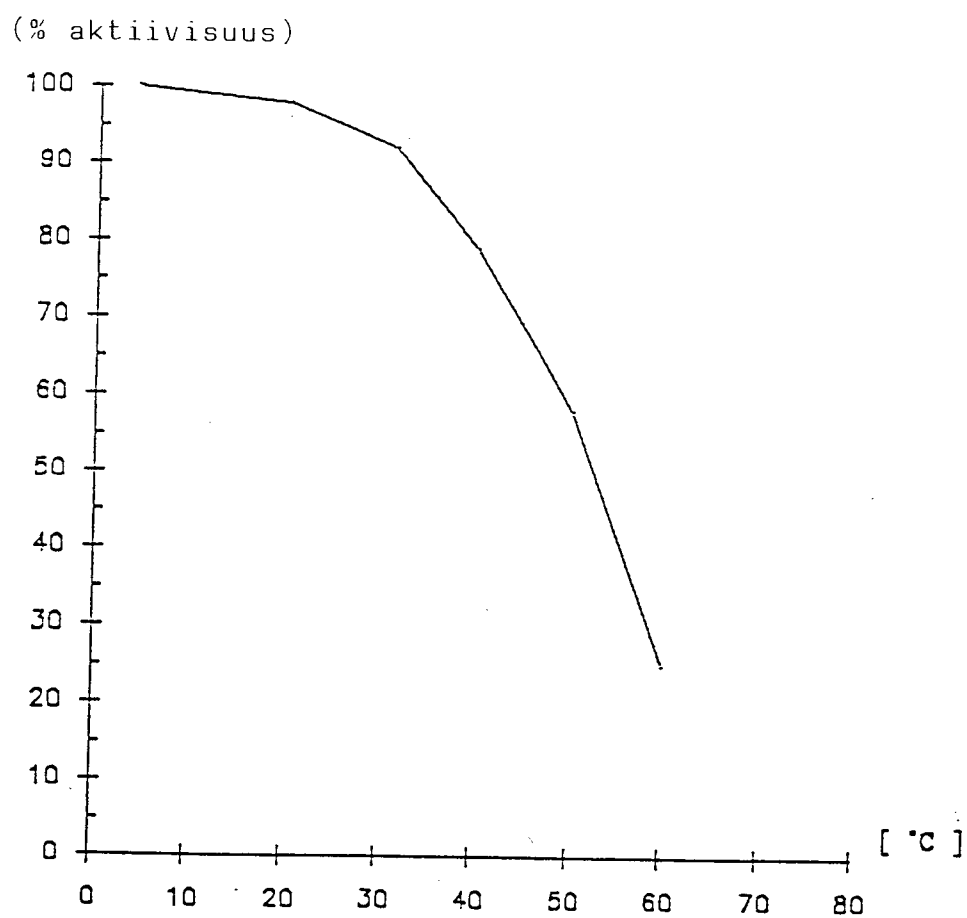


Fig.3

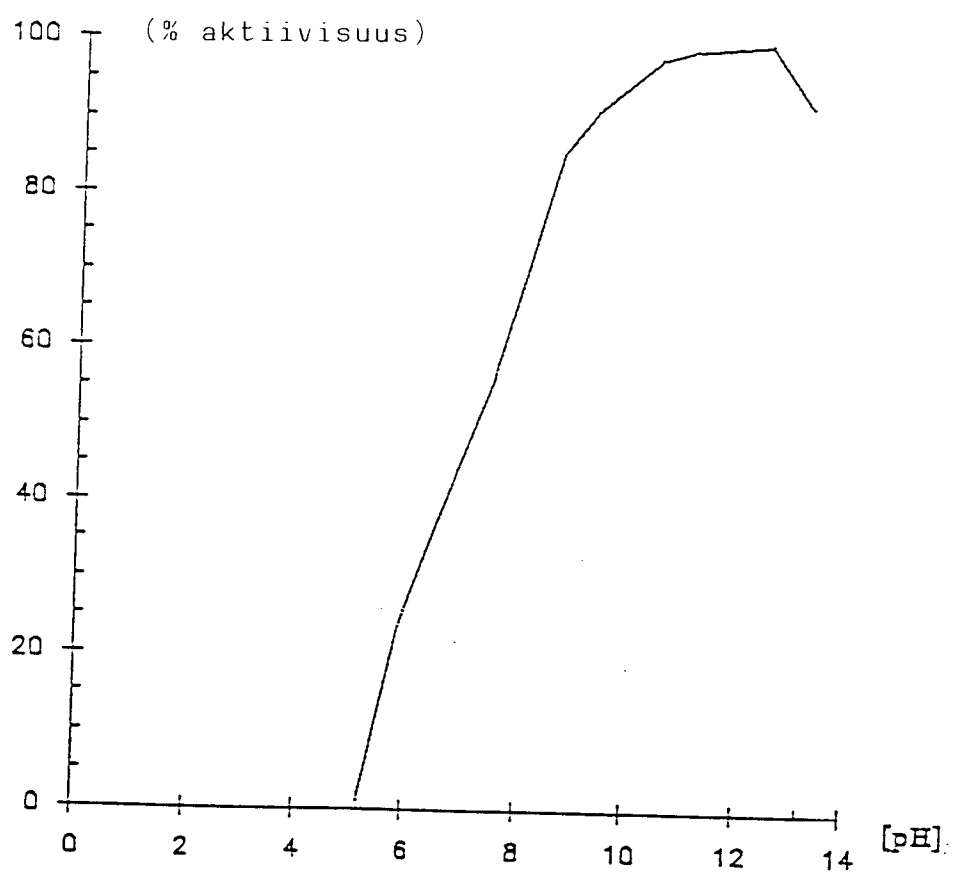


Fig.4

