

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 972792 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application **972792**

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

C12N 9/96

C12N 9/00

C12N 11/00

C11D 3/386

C11D 7/42

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **08.12.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.06.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.08.1997**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **08.12.1995 PCT/IB1995/001104**
Internationell ansökan - International
application

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

28.12.1994 US 365401

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Genencor International Inc., 4 Cambridge Place, 1870 South Winton Road, Rochester, NY 14618,
AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Shetty, Jayarama K., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Patel, Chimanbhai Purshottamdas, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Entsyymistabilointi

Enzymstabilisering

Entsyymistabilointi

Keksinnön ala

Käsillä oleva keksintö kohdistuu entsyymistabilointiin, erityisesti menetelmiin entsyymien stabiliteetin parantamiseksi nestemäisissä koostumuksissa, kuten pesuaineformulaatioissa, sekä edellä mainitulla tavalla valmistettuihin stabiloituihin, entsyymejä sisältäviin formulaatioihin, kuten entsyymiä sisältäviin nestemäisiin pesuaineformulaatioihin.

Keksinnön tausta

Ensisijainen ongelma, joka tavallisesti liittyy entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten, kuten pesuainekoostumusten, valmistukseen, on entsyymiä sisältävien aerosolien (tai sumutteidien) muodostuminen. Tällaiset entsyymiä sisältävät aerosolit ovat vakava huolen aihe työskentelyalueen turvallisuudelle. Tämä ongelma on erityisen akuutti silloin, kun valmistus- ja/tai formulointiolosuhteet liittyvät kaupalliseen mittakaavaan ja tarvitaan kaupallisia tuottajia, jotka huolehtivat erityisistä turvatoimenpiteistä näiden riskien alentamiseksi.

Toinen primaarinen ongelma nestemäisten, entsyymiä sisältävien koostumusten valmistuksessa ja käytössä on entsyymien stabiiliuden (ja siten aktiivisuuden) ylläpitäminen nestemäisessä koostumuksessa.

Entsyymien pysyvyyteen liittyvät ongelmat ovat erityisen akuutteja silloin, kun entsyymejä on sisällytetty sellaisiin nestemäisiin koostumuksiin, joiden vesipitoisuus ja/tai pH-arvo on korkea. Vesipitoisuus tällaisissa koostumuksissa liuottaa entsyymiä ja tämä johtaa entsyymaattisen aktiivisuuden häviämiseen. Tällaisten koostumusten korkea pH johtaa entsyymien denaturoitumiseen, joka johtaa entsyymaattisen aktiivisuuden häviämiseen.

Nestemäisissä pesuaineformulaatioissa on erityisiä ongelmia entsyymistabiloinnin suhteen. Tämä johtuu siitä,

että tällaisissa pesuaineformulaatioissa on usein sekä korkea vesipitoisuus että korkea pH. Nämä olosuhteet eivät ainoastaan liuota entsyymiä, vaan myös johtavat entsyymin denaturointiin samoin kuin vaikuttavat muutenkin negatiivisesti entsyymaattiseen pysyvyyteen ja aktiivisuuteen.

Edellä esitetyistä asioista johtuen on yritetty parantaa entsyymien stabiiliutta nestemäisissä koostumuksissa ja erityisesti pesuaineformulaatioissa siten, että niiden entsyymaattinen aktiivisuus säilyy kuljetuksen ja varastoinnin aikana.

Esimerkkejä ehdotuksista entsyymien stabiiliuden (varastoinninkestävyyden) parantamiseksi nestemäisissä lietemäisissä pesuainekoostumuksissa on erilaisten lisäaineiden käyttö. Tällaisia ehdotettuja lisäaineita ovat alkalimetallipentaboraatti (US-patentti 4 404 114), kalsiumionien ja alhaisen molekyylipainon omaavien karboksyylihappojen tai -suolojen kombinaatiot (US-patentit 4 318 818 ja 4 305 837) sekä antioksidantin ja hydrofiilisen polyolin kombinaatiot (US-patentti 4 243 543). Pelkistävien alkalimetallisuolojen, kuten natriumsulfiitin, käyttöä on ehdotettu erityisesti boorihappoa tai alkalimetalliboraattia sisältävien formulaatioiden ollessa kyseessä (US-patentti 4 462 922).

Valitettavasti tällaisten stabiloijien ja lisäaineiden käyttö ei aina ole toivottavaa tai hyödyllistä nestemäisissä koostumuksissa. Tämä johtuu ainakin osittain siitä tosiasiasta, että ne voivat johtaa pilaantuneiden jätevesien muodostumiseen ja/tai ne voivat tuottaa muita käyttöongelmia. Tällaisten stabiloijien ja lisäaineiden käyttö voi lisäksi lisätä niiden avulla valmistettujen koostumusten hintaa.

Stabiloijien käyttö ja läsnäolo sellaisissa entsyymissä sisältävissä koostumuksissa, joita edellä on mainittu, ei alenna tai poista entsyymiä sisältävien aerosolien (sumetteiden) muodostumiseen liittyvää ongelmaa.

Me emme ole tietoisia mistään julkaisusta, jossa kuvataan entsyymikiteiden käyttöä joko sellaisenaan tai kombinaatiossa stabilointiaineiden kanssa, jossa tätä olisi kuvattu, esitetty tai ehdotettu entsyymien stabiiliuden parantamiseksi nestemäisissä koostumuksissa. Todellakin ja ehkä juuri siitä tosiasiasta johtuen, että entsyymikiteet liukenevat nopeasti tällaisissa koostumuksissa (aiheuttaen huonon säilytyspysyvyyden), on entsyymikiteiden käyttöä vesipitoisissa formulaatioissa vältelty.

Entsyymikiteiden käyttöä on kuvattu paremman entsyymistabiliteetin saamiseksi kuivissa (rakeet) ja vedetömissä (liete) pesuainekoostumuksissa (kansainvälinen patenttihakemus WO 91/09 941), mutta niiden käyttö nestemäisissä koostumuksissa ja erityisesti nestemäisissä koostumuksissa, joiden vesipitoisuus on korkea (vesipitoiset koostumukset), on torjuttu. Tämä johtuu ainakin osittain siitä tosiasiasta, että tällaiset kiteet (kuten edellä kuvatut tavanomaiset entsyymimuodot) ovat helposti liukenevia. Sellaisenaan niillä olisi huono varastoinninkestävyys nestemäisissä koostumuksissa ja erityisesti korkean vesipitoisuuden omaavissa nestemäisissä koostumuksissa.

Vastaavasti voidaan nähdä, että jäljelle jää tarve antaa käyttöön ratkaisu ongelmaan entsyymiä sisältävien aerosolien (sumutteiden) muodostumisen alentamiseksi ja/ tai eliminoimiseksi valmistettaessa entsyymiä sisältäviä nestemäisiä koostumuksia ja erityisesti entsyymiä sisältäviä nestemäisiä pesuaineformulaatioita. Tässä suhteessa voidaan nähdä, että jäljelle jää tarve hankkia menetelmä stabiilien entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten, kuten nestemäisten pesuaineformulaatioiden tuottamiseksi samalla vähentäen tai eliminoiden näiden valmistukseen yleisesti liittyvien entsyymiä sisältävien aerosolien (sumutteiden) muodostumista. Lisäksi tässä suhteessa voidaan nähdä, että jäljelle jää tarve sellaisten stabiilien

entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten, kuten nestemäisten pesuaineformulaatioiden tuottamiseksi, joilla on alhaiset entsyymiä sisältävien aerosolien tasot.

5 Lisäksi voidaan nähdä, että jäljelle jää myös tarve antaa käyttöön ratkaisu ongelmaan entsyymien pysyvyyden parantamiseksi nestemäisissä koostumuksissa, erityisesti nestemäisissä pesuainekoostumuksissa niiden entsyymaattisen aktiivisuuden säilyttämiseksi. Jäljelle jää lisäksi tarve hankkia menetelmä stabiilien entsyymiä sisältävien koostu-
10 musten, kuten nestemäisten pesuaineformulaatioiden tuottamiseksi. Lisäksi jäljelle jää tarve hankkia stabiileja entsyymiä sisältäviä nestemäisiä koostumuksia, kuten nestemäisiä pesuaineformulaatioita, joissa entsyymi säilyttää olennaisen osan entsyymaattisesta aktiivisuudesta pitkä-
15 kin aikoja.

Keksinnön yhteenveto

Käsillä olevan keksinnön ensisijainen kohde on antaa käyttöön stabiileja, entsyymiä sisältäviä nestemäisiä koostumuksia ja erityisesti nestemäisiä koostumuksia, jotka ovat vesipitoisia (vesipitoiset koostumukset).
20

Toinen käsillä olevan keksinnön mukainen kohde on antaa käyttöön stabiileja, entsyymiä sisältäviä nestemäisiä pesuaineformulaatioita ja erityisesti sellaisia nestemäisiä pesuaineformulaatioita, jotka ovat vesipitoisia (vesipitoiset koostumukset).
25

Vielä eräs käsillä olevan keksinnön mukainen kohde on antaa käyttöön menetelmä stabiilien, entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten valmistamiseksi ja erityisesti sellaisten nestemäisten koostumusten valmistamiseksi, jotka ovat vesipitoisia (vesipitoiset koostumukset).
30

Vielä eräs käsillä olevan keksinnön mukainen kohde on antaa käyttöön menetelmä stabiilien, entsyymiä sisältävien nestemäisten pesuaineformulaatioiden valmistamiseksi ja erityisesti sellaisten nestemäisten pesuaineformulaati-

oiden valmistamiseksi, jotka ovat vesipitoisia (vesipitoiset koostumukset).

5 Vielä eräs käsillä olevan keksinnön mukainen kohde on alentaa tai poistaa entsyymiä sisältävän aerosolin (sumutteeseen) muodostumiseen liittyvät ongelmat entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten, kuten entsyymiä sisältävien pesuaineformulaatioiden valmistuksen aikana.

10 Käsillä olevan keksinnön mukaisesti annetaan käyttöön menetelmä stabiilien, entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten valmistamiseksi. Tässä menetelmässä muodostetaan kiinnostuksen kohteena olevan entsyymin liukenemattomia muotoja, jotka sisällytetään nestemäiseen koostumukseen. Tässä menetelmässä lisäksi yhdistetään nestemäisessä formulaatiossa entsyymi liukenemattomassa muodossaan aineen kanssa entsyymin säilyttämiseksi liukenemattomassa muodossaan. Tällä tavoin annetaan käyttöön käsillä olevan keksinnön mukaisia stabiileja, entsyymiä sisältäviä nestemäisiä koostumuksia.

20 Entsyymin liukenemattomat muodot voidaan edullisesti muodostaa kiteyttämällä entsyymi, jolloin muodostuu ja annetaan käyttöön entsyymikiteitä. Vaihtoehtoisesti voidaan liukenemattomia muotoja antaa käyttöön muodostamalla entsyymin amorfisia muotoja, jolloin muodostuu ja annetaan käyttöön amorfinen entsyymi.

25 Edullisessa suoritusmuodossa menetelmä käsittää mielenkiinnon kohteena olevan entsyymin liukenemattomien muotojen muodostamisen samalla kun aineen läsnä ollessa entsyymi pysyy liukenemattomassa muodossaan.

30 Toisessa edullisessa suoritusmuodossa menetelmä käsittää mielenkiinnon kohteena olevan entsyymin liukenemattomien muotojen muodostamisen ennen mainitun entsyymin liukenemattoman muodon yhdistämistä aineen kanssa entsyymin ylläpitämiseksi liukenemattomassa muodossaan.

35 Entsyymi on edullisesti proteaasi. Erityisen edullisessa suoritusmuodossa entsyymi on seriiniproteaasi.

Toisessa erityisen edullisessa suoritusmuodossa entsyymi on alkalinen proteaasi.

Vaihtoehtoisesti entsyymi on alfa-amylaasi.

5 Lisäksi on edullista, että käsillä olevan keksinnön mukaista menetelmää voidaan käyttää stabiilien, entsyymiä sisältävien nestemäisten pesuaineformulaatioiden valmistuksessa.

10 Edullisesti aine, jolla entsyymi pidetään liukene-mattomassa muodossaan, on kiteytysaine. Erityisen edullisessa suoritusmuodossa kiteytysaine on natriumkloridi.

Haluttaessa voi nestemäinen formulaatio olla vesi-pitoinen formulaatio eli formulaatio, joka sisältää vettä. Vielä niin haluttaessa voi tämä nestemäinen formulaatio olla vesipitoinen formulaatio, joka sisältää vettä 50 ti-lavuusprosenttia tai enemmän.

20 Toisessa käsillä olevan keksinnön mukaisessa koh-teessa annetaan käyttöön stabiilit, entsyymiä sisältävät nestemäiset koostumukset. Tällaisia nestemäisiä koostumuk-sia ovat nestemäinen formulaatio, liukenematon entsyymi ja aine, joka pitää liukenemattoman entsyymin liukenematto-massa (kiteisessä tai amorfisessa) muodossaan. Tällaisissa koostumuksissa liukenematon entsyymi pidetään liukenemat-tomassa (kiteisessä tai amorfisessa) muodossaan samalla kun entsyymiä sisältävien aerosolien (tai sumutteiden) muodostuminen vältetään olennaisesti. Tällaisissa formu-
25 laatioissa liukenematon entsyymi pidetään lisäksi liukene-mattomassa (kiteisessä tai amorfisessa) muodossa (tilassa) samalla kun entsyymi pysyy stabiilina ja säilyttää olen-naisen osan entsyymaattisesta aktiivisuudestaan.

30 Edullinen liukenematon entsyymimuoto on kiteinen muoto, jonka avulla entsyymikiteet muodostuvat ja annetaan käyttöön. Vaihtoehtoisesti voi liukenematon entsyymimuoto olla amorfinen muoto.

35 Edullisessa suoritusmuodossa menetelmä käsittää mielenkiinnon kohteena olevan entsyymin liukenemattomien

muotojen muodostamisen sellaisen aineen läsnä ollessa, joka pitää entsyymin liukenemattomassa muodossaan.

Toisessa edullisessa suoritusmuodossa menetelmä käsittää mielenkiinnon kohteena olevan entsyymin liu-
 5 kenemattomien muotojen muodostamisen ennenkuin mainittu entsyymin liukenematon muoto yhdistetään sellaisen aineen kanssa, joka pitää entsyymin liukenemattomassa muodossaan.

Entsyymi on edullisesti proteaasi. Erityisen edul-
 10 lisessa suoritusmuodossa entsyymi on seriiniproteaasi. Toisessa erityisen edullisessa suoritusmuodossa entsyymi on alkalinen proteaasi.

Vaihtoehtoisesti entsyymi on alfa-amylaasi.

Edullisesti aine, joka ritää entsyymin liukenemat-
 15 tomassa muodossaan on kiteytysaine. Erityisen edullisessa suoritusmuodossa kiteytysaine on natriumkloridi.

Lisäksi on edullista, että käsillä olevan keksinnön mukaiset stabiilit, entsyymiä sisältävät nestemäiset koostumukset käsittävät stabiilit, entsyymiä sisältävät neste-
 20 mäiset pesuaineformulaatit.

Haluttaessa voi nestemäinen formulaatio olla vesipitoinen formulaatio eli formulaatio, joka sisältää vettä. Vielä niin haluttaessa voi tämä nestemäinen formulaatio olla vesipitoinen formulaatio, joka sisältää vettä 50 ti-
 25 lavuusprosenttia tai enemmän.

Nämä ja muutkin käsillä olevan keksinnön kohteet ja keksinnön mukaisten kostumusten ja menetelmien edut tulevat helposti ilmeisiksi luettaessa seuraavaa kuvausta suoritus-esimerkeistä yhdessä sitä seuraavien esimerkkien
 30 kanssa.

Edullisten suoritusmuotojen kuvaus

Käsillä olevan keksinnön ensisijainen kohde on se, että nestemäisissä koostumuksissa, joissa entsyymi säilyy liukenemattomassa muodossa (kiteisenä tai amorfisena),
 35 entsyymin säilyvyysstabiilius paranee. Tämä johtuu ainakin

osittain siitä tosiasiasta, että entsyymin liukenematon (kiteinen tai amorfinen) muoto on vastustuskykyisempi denaturoitumista vastaan äärimmäisissä olosuhteissa pH:n, lämmön, varastoinnin, ja muiden vastaavien tekijöiden suhteen. Tämä johtuu lisäksi ainakin osittain siitä tosiasiasta, että (nestemäisissä koostumuksissa) liukenemattomassa (eli kiteisessä tai amorfisessa) muodossa olevat entsyymit ovat vähemmän aktiivisia kuin liukoisisissa muodoissa olevat entsyymit.

Vastaavasti käsillä olevan keksinnön mukaiset stabiilit, entsyymiä sisältävät nestemäiset koostumukset ovat entsyymiä sisältäviä nestemäisiä koostumuksia, joissa entsyymi pidetään liukenemattomassa muodossa (eli kiteisenä tai amorfisena). Tässä liukenemattomassa muodossa entsyymi on vastustuskykyisempi denaturoitumista vastaan äärimmäisissä olosuhteissa pH:n, lämmön, kosteuden ja muiden vastaavien tekijöiden suhteen. Tällä tavalla entsyymi pysyy stabiilina ja aktiivisena pitkiä ajanjaksoja ennen käyttöä. Tällaiset käsillä olevan keksinnön mukaiset entsyymiä sisältävät nestemäiset koostumukset käsittävät pesuaineformulaatiot, joissa entsyymi pysyy stabiilina, jolloin olennainen osa sen entsyymaattisesta aktiivisuudesta säilyy pitkiäkin aikoja.

Käsillä olevan keksinnön mukaiset stabiilit, entsyymiä sisältävät nestemäiset koostumukset sisältävät entsyymiä liukenemattomassa (kiteisessä tai amorfisessa) muodossa, ainetta, joka pitää entsyymin liukenemattomassa muodossaan (eli entsyymiä kiteyttävä aine) ja nesteformulaatiota, jossa liukenematon entsyymi ja aine, joka pitää entsyymin liukenemattomassa muodossa, yhdistetään.

Aine, jonka avulla entsyymi pysyy liukenemattomassa muodossaan, voi olla mikä tahansa sellainen aine, joka on alan ammattilaiselle sinänsä tuttu. Edullisesti tämä aine on entsyymiä kiteyttävä aine. Edullinen kiteytysaine, jolla kiteinen entsyymi voidaan yhdistää nestemäisissä formu-

laatioissa käsillä olevan keksinnön mukaisesti, voi olla ammoniumsulfaatti, natriumkloridi (US-patentit 5 041 377 ja 5 256 557), orgaaninen happo (katso kansainvälinen patenttijulkaisu WO 91/09 943 ja US-patentti 5 281 526) ja
 5 aminohappo (katso US-patenttihakemus 865 252, jätetty 8.4.1992). Natriumkloridin käyttö on erityisen edullista tässä suhteessa.

Käsillä olevan keksinnön mukaisissa menetelmissä käytetyn (kiteyttävän) aineen määrät (pitoisuudet) entsyy-
 10 min pitämiseksi liukenemattomassa muodossaan eli jotka sisällytetään käsillä olevan keksinnön mukaisiin nestemäisiin koostumuksiin vaihtelevat tarpeen mukaan riippuen formulaatiotyypistä ja täsmällisestä formulaatiosta, johon entsyymin ja (kiteyttävä) aine entsyymin pitämiseksi liuke-
 15 nemattomassa muodossa lisätään samoin kuin olosuhteista, joissa muodostettua koostumusta käytetään ja/tai jossa sitä säilytetään ennen käyttöä. Tällaiset vaihtelut ovat alan ammattilaisille sinänsä tunnettuja.

On huomattava, että lisättävän kiteytysaineen pi-
 20 toisuus lopullisessa koostumuksessa vaihtelee välillä noin 2 - noin 10 prosenttia (w/v). Kiteytysaineen pitoisuus noin 5 prosenttia (w/v) on edullinen.

Entsyymit, joita voidaan käyttää käsillä olevan keksinnön mukaisissa koostumuksissa ja menetelmissä käsit-
 25 tävät sellaiset entsyymit, jotka pysyvät liukenemattomassa muodossa (eli kiteisinä tai amorfisina). Edullisesti tällaiset entsyymit ovat proteaaseja, käsittäen myös seriini-proteaasit (kuten subtilisiinit ja subtilisiinin tyypiset proteaasit), neutraalit proteaasit ja alkaliset proteaasit. Esimerkkejä tällaisista proteaaseista ovat alkaliset proteaasit, joita myydään kauppanimillä OPTIMASE (SOLVAY ENZYMES, Inc.) ja OPTICLEAN (SOLVAY ENTZYME, Inc.).
 30

Muita entsyymejä, joiden käyttö käsillä olevan keksinnön mukaisissa koostumuksissa on mahdollista, ovat al-
 35 fa-amylaaseja, kuten ne alfa-amylaasit, joita myydään kau-

ppanimillä TENASE (SOLVAY ENZYMES, Inc.) ja TAKATHERM (SOLVAY ENZYMES, Inc.), muut amylaasit, lipaasit, sellulaasit ja/tai mikä tahansa muu entsyymi, jota yleisesti käytetään pesuainekoostumuksissa (eli vaatteiden ja astioiden pesuun tarkoitetuissa koostumuksissa).

Myös näiden entsyymien proteiininmuokatut variantit ja nestemäisissä koostumuksissa olevien erilaisten entsyymisysteemien kombinaatiot kuuluvat käsillä olevan keksinnön piiriin.

Käsillä olevan keksinnön mukaisiin koostumuksiin sisällytettävä täsmällinen entsyymi (tai entsyymien kombinaatio) vaihtelee koostumuksen aiotusta käytöstä riippuen. Esimerkiksi kankaiden, kuten vaatteiden pesuun tarkoitettut pesuainekoostumukset sisältävät alkalisia proteaaseja. Entsyymien kombinaatioita voidaan myös käyttää käsillä olevassa keksinnössä olosuhteiden niin vaatiessa.

Käsillä olevan keksinnön mukaisissa menetelmissä käytettävän entsyymin määrä (pitoisuus), joka sisällytetään käsillä olevan keksinnön mukaisiin koostumuksiin, myös vaihtelee ja tämä riippuu vaaditusta tyypistä ja täsmällisestä formulaatiosta, johon entsyymi lisätään, koostumukseen lisättävästä kiteytysaineesta, jolla entsyymi pidetään liukenemattomassa muodossaan ja olosuhteista, joissa muodostettua koostumusta käytetään ja/tai varastoidaan ennen käyttöä. Alan ammattilaiset pystyvät määrittämään tällaiset muuttujat.

Kuitenkin lopulliseen formulaatioon sisällytettävän entsyymin pitoisuus on vähintään noin 0,01 prosenttia (w/v) ja täsmällisemmin vähintään noin 0,1 prosenttia (w/v). Vielä edullisempaa on se, että mainitun entsyymin pitoisuus on vähintään noin 0,5 prosenttia (w/v). Edullisinta on, kun mainitun entsyymin pitoisuus on vähintään noin 1,0 prosenttia (w/v). Edullista on myös se, että entsyymin pitoisuus on vähintään noin 2,0 prosenttia (w/v).

Lisäksi toisaalta lopulliseen formulaatioon sisällytettävän entsyymin pitoisuus ei ole suurempi kuin noin 5,0 prosenttia (w/v) ja täsmällisemmin alle noin 2,0 prosenttia (w/v). Edullisinta on, kun mainitun entsyymin pitoisuus on vähintään noin 1,0 prosenttia (w/v). Edullista on myös se, että entsyymin pitoisuus ei ole suurempi kuin noin 0,5 prosenttia (w/v). Edullista on myös se, että entsyymin pitoisuus on vähintään noin 0,1 prosenttia (w/v).

Käsillä olevan keksinnön mukaisiin nestemäisiin koostumuksiin sisällytettävän entsyymin täsmällinen liukenematon muoto (fysikaalinen tila) voi myös vaihdella formulaation fysikaalisesta tilasta ja sen aiotusta käytöstä riippuen. Alan ammattilaiset pystyvät määrittämään tällaiset muunnelmät.

Käsillä olevan keksinnön mukainen nestemäinen formulaatio, jossa liukenemattomat (kiteiset tai amorfiset) entsyymit ja entsyymin liukenemattomassa tilassaan pitävä aine (kuten kiteytysaine) yhdistetään, voi olla mikä tahansa sopiva nestemäinen formulaatio. Tällaiset formulaatiot voivat niin haluttaessa sisältää muita lisäkomponentteja, kuten pinta-aktiivisia aineita (eli anionisia pinta-aktiivisia aineita, kuten lineaarinen alkyylisentseenisulfonaatti, ionittomia pinta-aktiivisia aineita, kuten alkolietoksyylaatti, kationisia pinta-aktiivisia aineita tai amfoteerisen ionin), stabilointiaineita (eli propyleeniglykoli) ja pH-puskureita muutamien mainitsemiseksi. Tässä suhteessa on huomautettava, että käsillä olevan keksinnön periaatteet soveltuvat nestemäisiin formulaatioihin, jotka sisältävät vettä, käsittäen vesipitoiset lieteformulaatiot. Käsillä olevan keksinnön menetelmät ja periaatteet todellakin soveltuvat myös niihin nestemäisiin formulaatioihin, joiden vesipitoisuus on suurempi kuin 50 tilavuusprosenttia.

Kuten edellä on mainittu, voivat käsillä olevan keksinnön mukaiset nestemäiset formulaatiot olla niin ha-

luttaessa pesuaineformulaatioita. Käsillä olevan keksinnön periaatteet soveltuvat erityisesti pesuaineformulaatioiden tuotantoon, varastointiin ja käyttöön. Erityisesti on huomattava, että käsillä olevan keksinnön periaatteet soveltuvat ja ovat hyödyllisiä vettä sisältävien nestemäisten pesuainekoostumusten tuottamisessa, varastoinnissa ja käytössä. Esimerkkejä tällaisista kaupallisesti saatavilla olevista pesuaineformulaatioista ovat DOUBLE POWER SURF (Lever Brothers, Inc., USA), DYNAMO (Colgate-Palmolive, Inc., USA) ja STAIN OUT (Clorax, Inc, USA).

Käsillä olevan keksinnön mukaiset pesuainekoostumukset (formulaatiot), joihin liukenemattomat (kiteiset tai amorfiset) entsyymit ja entsyymien liukenemattomassa tilassaan pitävä aine (kuten kiteytysaine) yhdistetään, voi olla mikä tahansa sopiva pesuainekoostumus (formulaatio). Tällaiset formulaatiot voivat niin haluttaessa sisältää komponentteja, kuten pinta-aktiivisia aineita (eli anionisia pinta-aktiivisia aineita, kuten lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti, ionittomia pinta-aktiivisia aineita, kuten alkoholietoksyylaatti, kationisia pinta-aktiivisia aineita tai amfoteerisen ionin sisältäviä pinta-aktiivisia aineita), stabilointiaineita (eli propyleeniglykoli), muita entsyymejä (käsittäen, näihin kuitenkin rajoittumatta, amylaasit, sellulaasit, peroksidaasit ja oksidaasit), pesuainerakentajia (kuten tseoliitit, difosfaatit ja trifosfaatit), lisäaineita (kuten hiilihydraattisidonta-aineet, kuten dekstriinit ja selluloosajohdannaiset, kuten hydroksipropyyliselluloosa ja metyyliiselluloosa) ja pH-puskureita (pesuainekoostumuksen pitämiseksi halutussa pH:ssa) käsittäen fosfaatti- ja hiilisuolat.

Käsillä olevan keksinnön mukaisia stabiileja, entsyymiä sisältäviä nestemäisiä koostumuksia voidaan käyttää useisiin tarkoituksiin, joihin niitä on formuloitu. Tässä suhteessa pesuainekoostumuksia voidaan käyttää puhdistuskoostumuksissa vaatteiden, astioiden (esimerkiksi astian-

pesukoneissa) ja/tai muiden puhdistuksen tarpeessa olevien pintojen pudistuksessa.

Eräs ensisijainen käsillä olevan keksinnön kohde on se, kuten olemme havainneet, että yhdistettäessä nestemäisessä formulaatiossa sopivaa entsyymiä liukenemattomassa muodossaan (kiteinen tai amorfinen) yhdessä sopivan aineen (kuten kiteytysaineen) kanssa, joka pitää entsyymin liukenemattomassa muodossaan, saadaan käyttöön entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, jossa entsyymi osoittaa merkittävää paranemista varastoinninkestävytyden suhteen.

Käsillä olevan keksinnön mukainen menetelmä käsillä olevan keksinnön mukaisten entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten valmistamiseksi käsittää entsyymin muodostuksen kyseessä olevaan liukenemattomaan muotoon. Tässä suhteessa menetelmä voi käsittää kyseisen entsyymin kiteyttämisen. Vaihtoehtoisesti menetelmä voi käsittää entsyymin muodostamisen siten, että se on amorfisessa muodossaan. Sitten tämän entsyymin muodostuksen jälkeen liukenemattomassa muodossa (kiteinen tai amorfinen) oleva entsyymi yhdistetään sellaisen aineen kanssa, joka säilyttää entsyymin liukenemattomassa muodossaan (kuten entsyymin kiteytysaine), jolloin entsyymin liukenematon rakenne (kiteinen tai amorfinen) säilyy nestemäisessä formulaatiossa. Tällä tavoin saadaan käsillä olevan keksinnön mukaisia stabiileja, entsyymiä sisältäviä koostumuksia.

Entsyymien kiteytys voidaan käsillä olevan keksinnön menetelmän mukaisesti suorittaa millä tahansa sinänsä tunnetulla menetelmällä. Tällaisia menetelmiä on kuvattu US-patentissa 5 256 557, jossa entsyymit kiteytetään käyttämällä aminohappoja ja/tai orgaanista happoa. Muita sopivia menetelmiä on kuvattu US-patentissa 5 281 526.

Amorfisessa muodossaan olevia entsyymejä voidaan muodostaa käsillä olevan keksinnön mukaisesti millä tahansa sinänsä tunnetulla sopivalla menetelmällä. Tällaisia menetelmiä on kuvattu US-patentissa 4 673 647.

Liukenemattoman (kiteisen) entsyymin ja entsyymin liukenemattomassa muodossaan pitävän aineen (kiteutysaine) yhdistäminen halutussa formulaatiossa (kuten pesuaineformulaatioissa) voidaan suorittaa usealla eri tavalla.

5 Liukenemattoman entsyymin ja mainitun aineen yhdistäminen voidaan suorittaa muodostamalla entsyymin liukene-
maton muoto aineen läsnä ollessa entsyymin pitämiseksi
liukenemattomassa muodossaan (ja nestemäinen formulaatio,
kuten se, josta ja/tai jossa entsyymin liukenematon muoto
10 muodostettiin). Tällä tavoin muodotunut liukenematon ent-
syymin yhdistetään (heti) liukenemattomassa muodossa olevan
entsyymin kanssa nestemäisessä formulaatiossa, jossa ent-
syymin muodostettiin mainituksi liukenemattomaksi muodok-
seen.

15 Vaihtoehtoisesti liukenemattoman entsyymin ja mai-
nitun aineen yhdistäminen voidaan suorittaa ensin muodos-
tamalla entsyymin liukenematon muoto ja sitten lisäämällä
mainittu aine siihen. Tässä tapauksessa mainittu aine voi
olla joko liuoksessa (nestemäisessä koostumuksessa) lisät-
20 täessä liukenemattomassa muodossa olevaan entsyymin si-
ten, että liukenematon entsyymin ja aine yhdistetään neste-
mäisen koostumuksen läsnä ollessa. Vaihtoehtoisesti voi-
daan nestemäinen koostumus lisätä seokseen, jossa on ent-
syymin liukenemattomassa muodossaan ja mainittua ainetta
25 siten, että mainittu liukenematon entsyymin ja mainittu
aine yhdistetään nestemäisen koostumuksen läsnä ollessa.

On kuitenkin huomattava, että riippumatta valitusta
menetelmästä, yhdistetään kaikissa tapauksissa liukenemat-
tomassa muodossaan oleva entsyymin ja mainittu aine neste-
mäisen koostumuksen läsnä ollessa siten, että aine sitoo
30 nestettä (eli vettä) ja säilyttää siten entsyymin liukene-
mattomassa muodossaan.

Liukenemattomassa muodossaan olevan entsyymin ja
entsyymin liukenemattomassa muodossaan pitävän aineen yh-
35 distäminen tulisi suorittaa lämpötiloissa, jotka eivät

vaikuta entsyymien aktiivisuuteen (kuten esimerkiksi denaturoimalla entsyymi). Tässä suhteessa lämpötilat, jotka eivät ole alhaisempia kuin noin 5 °C ja eivät korkeampia kuin noin 50 °C, ovat edullisia.

5 Liukenemattomassa muodossaan olevan entsyymien ja entsyymien liukenemattomassa muodossaan olevan aineen yhdistäminen tulisi suorittaa pH:ssa, joka ei vaikuta entsyymien aktiivisuuteen (kuten esimerkiksi denaturoimalla entsyymi). Tässä suhteessa pH-arvot, jotka eivät ole al-
10 haisempia kuin noin 4,0 ja eivät korkeampia kuin noin 13,0, ovat edullisia.

On huomattava, että edellä kuvatun käsillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän käyttö käsillä olevan keksinnön mukaisten satbiien, entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten valmistamiseksi vähentää merkittävästi entsyymiä sisältävien aerosolien (sumutteen) muodostumiseen liittyviä ongelmia. Tämä saavutetaan sisällyttämällä liukenematon (eli kiteinen) entsyymi nestemäiseen formulaatioon ja säilyttämällä entsyymien liukenematon (eli kiteinen rakenne) muoto nestemäisissä koostumuksissa (kuten pesuainekoostumuksissa).
15

Käsillä oleva keksintö on edullinen sen vuoksi, että se antaa käyttöön paremman stabiiliuden (ja tämän vuoksi sillä on taloudellista vaikutusta) ja turvallisuuden (vähemmän allergeeninen).
20

Täten on käsillä olevan keksinnön mukaisia stabiileja, entsyymiä sisältäviä nestemäisiä koostumuksia, kuten pesuainekoostumuksia, samoin kuin käsillä olevan keksinnön mukaisia menetelmiä kuvattu sellaisten stabiilien, entsyymiä sisältävien nestemäisten koostumusten, kuten pesuainekoostumusten valmistamiseksi ja seuraavat esimerkit kuvaavat käsillä olevaa keksintöä sitä kuitenkaan millään lailla rajoittamatta.
25
30

Esimerkki 1

Alkalista proteaasia saatiin mikrobista *Bacillus alkalophilus* ja se kiteytettiin kuvattujen menetelmien mukaisesti ja olosuhteissa, jotka on kuvattu US-patentin 5 256 557 esimerkissä 1. Tällaisessa menetelmässä alkali-

5 sen proteaasin kiteet muodostetaan 10 prosenttisen (w/v) natriumkloridin läsnä ollessa (aine, jokapitää entsyymin kiteisessä muodossaan). Tällä tavoin stabiloitu alkalinen proteaasi muodostettiin siten, että se on liukenemattomas-

10 sa (kiteisessä) muodossaan, jossa sitä ylläpidetään natriumkloridilla.

Sitten kiteinen entsyymikonsentraatti laimennettiin noin 1 000 000 DU/g:n (Delftin yksikköä per gramma) aktiivisuuteen lisäämällä tislattua vettä (pH 6,5 - 7,0).

15 Liuoksen vakioimiseksi siihen lisättiin natriumkloridia, jolloin natriumkloridipitoisuus saatiin 10 prosenttiin (w/v). Liuokseen lisättiin myös seuraavia ainesosia ja niiden pitoisuudet olivat seuraavat: boorihappoa lisättiin, jolloin pitoisuus 1,0 % (w/v); kalsiumkloridia lisättiin konsentraation saamiseksi arvoon 1m0 % (w/v); ja kiinteitä aineksia maissisiirapista lisättiin, jolloin niiden kuiva-ainepitoisuus oli > 50 % (w/v) (dbs).

Liuoksen pH säädettiin arvoon 4,5 happamalla hapolla (0,1 M).

25 Tällä tavoin tuotettiin käsillä olevan keksinnön mukaista stabiilia, kiteistä entsyymiä sisältävää nestemäistä koostumusta.

Esimerkki 2

0,1 M boraattipuskuriliuosta (pH 8,5) valmistettiin ja se sisälsi boorihappoa (0,1 M) ja natriumboraattia (0,1 M) vedessä.

Sitten stabiili, kiteistä entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, joka sisälsi 10 tilavuusprosenttia entsyymiä kiteyttävää ainetta (natriumkloridi), lisättiin

35 (1:1 v/v suhteessa) boraattipuskuriin siten, että muodos-

tui stabiilia, kiteistä entsyymiä sisältävää nestemäistä koostumusta, joka sisälsi 5 tilavuusprosenttia entsyymiä kiteyttävää ainetta (natriumkloridia). Tämän nestemäisen koostumuksen alkalisen proteaasin alkuperäinen aktiivisuus oli 500 000 - 800 000 DU/g.

Saatiin saman alkalisen proteaasin nestemäistä formulaatiota (alkuperäinen aktiivisuus 1 000 000 DU/g, joka oli formuloitu propyleeniglykolissa, jota myydään kauppanimellä OPTICLEAN L-1000 (SOLVAY ENZYMES, Inc.).

Tämän jälkeen vastaavia näytteitä sekä käsillä olevan keksinnön mukaista nestemäistä koostumusta, jolla oli tämän alkalisen proteaasin kidemuoto, että propyleeniglykolissa formuloidun alkalisen proteaasin nestemäistä koostumusta inkuboitiin 50 °C:ssa pH:ssa 8,5, ja niistä otettiin määritysnäytteitä tiettyinä ajanjaksoina (0, 3, 6, 12, 24 ja 38 tuntia) ja alkalisen proteaasin aktiivisuus mitattiin käyttämällä kuvattua menettelytapaa ja US-patentin 5 256 557 esimerkissä 1 esitetyissä olosuhteissa.

Yhteenvedo näiden kokeiden tuloksista on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Inkubointiaika (h)	Jäljellä oleva aktiivisuus, %	
	Neste	Kiteet
50 °C, pH 8,5		
0	100	100
3	71	95
6	60	80
12	45	83
24	20	80
38	7,5	65

Kuten taulukosta 1 voidaan nähdä, on alkalisen proteaasin kiteinen (liukenematon) muoto stabiilimpi korkeassa pH:ssa ja korkeassa lämpötilassa kuin sama alkalinen proteaasi liukoisessa muodossa.

5

Esimerkki 3

Nestemäisessä muodossaolevan alkalisen proteaasin (OPTICLEAN L-1000) ja esimerkin 1 mukaisten stabiloidun kiteisen alkalisen proteaasin kiteitä stabiilisuutta vedessä verrattiin sitten eri pH-arvoissa.

10

Stabiilia kiteistä entsyymiä sisältävää nestemäistä koostumusta, joka sisälsi 10 % (w/v) entsyymiä kiteyttävää ainetta (natriumkloridia) esimerkistä 1, lisättiin sitten (1:1 suhteessa, v/v) boraattipuskuriin, kuten esimerkissä 2 on kuvattu siten, että muodostui stabiili kiteinen entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, joka sisälsi 5 % (w/v) entsyymiä kiteyttävää ainetta (natriumkloridia). Tämän nestemäisen koostumuksen alkalisen proteaasin alkuperäinen aktiivisuus oli noin 5 000 000 - 800 000 DU/g.

15

Nestemäistä OPTICLEAN L-1000:a saatiin kuten esimerkissä 2 on kuvattu.

20

Tämän jälkeen vastaavia näytteitä sekä käsillä olevan keksinnön mukaista nestemäistä koostumusta, jolla oli tämän alkalisen proteaasin kidemuoto, että propyleeniglykolissa formuloidun alkalisen proteaasin nestemäistä koostumusta inkuboitiin eri pH-arvoissa (eli pH 4 - pH 10,0) 50 °C:ssa 24 tuntia, ja tänä aikana otettiin määritysnäytteitä ja alkalisen proteaasin aktiivisuus mitattiin käyttämällä kuvattua menettelytapaa ja US-patentin 5 256 557 esimerkissä 1 esitetyissä olosuhteissa.

25

30

Yhteenveto näiden kokeiden tuloksista on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2

Inkubointi-pH	Jäljellä oleva aktiivisuus, % 50 °C, 24 h	
	Neste	Kiteet
pH 4,0	27,5	36,5
pH 6,0	28,0	37,4
pH 8,0	37	51,0
pH 9,0	20	32,0
pH 10,0	14	30,0

Kuten taas taulukon 2 tulokset vahvistavat, on entsyymien kiteinen (liukenematon) muoto stabiilimpi kuin entsyymi liukoisessa muodossa.

Esimerkki 4

Tämän jälkeen verrattiin alkalisen proteaasin nestemäisen muodon stabiilisuutta käsillä olevan keksinnön mukaiseen stabiiliin kiteisen alkalisen proteaasin formulaatioon vesipitoisessa lietteisessä pesuaineformulaatiossa.

Stabiili kiteinen entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, joka sisälsi 10 tilavuusprosenttia entsyymiä kiteyttävää ainetta (natriumkloridia) saatiin, kuten edellä esimerkissä 1 on kuvattu.

Sitten kiteet konsentroitiin pitoisuuteen noin 5 000 000 DU/g käyttämällä mikrosuodatusta, kuten myös US-patentin 5 256 557 esimerkissä 1 on kuvattu.

Tämän jälkeen sekoitettiin yksi osa (w/w) kiteistä konsentraattia (100 g) neljä osaa lietteistä pesuainepohjaa (400 g) ja näin saatiin alkalisia proteaasikiteitä pesuainealustassa, jonka aktiivisuus oli ekvivalentti OPTICLEAN L-1000 (1 000 000 DU/g) proteaasiaktiivisuuteen.

Vesipitoinen pesuainelieteformulaatio, jota tässä testattiin, on kaupallisesti saatavilla oleva formulaatio, joka tunnetaan nimellä DOUBLE POWER SURF (Lever Brothers, Inc., USA). Tämä formulaatio sisältää aktiivista nestemäistä entsyymiä. Niinpä ennen testattavien alkalisten proteaasien lisäämistä pesuaineformulaatioihin, inaktivoitiin aiemmin tässä pesuaineformulaatiossa ollut entsyymi lämmittämällä pesuainelietettä 60 °C:ssa, kunnes kaikki aktiivinen entsyymi oli tuhoutunut (10 minuuttia). Sitten tätä jäljelle jäänyttä vesipitoista lietemäistä pesuaineformulaatiota käytettiin peruspesuaineformulaationa käsillä olevan keksinnön mukaisten formulaatioiden stabiilisuuden testauksessa.

Nestemäistä OPTICLEAN L-1000:a saatiin kuten esimerkissä 2 on kuvattu.

Tämän jälkeen vastaavia näytteitä käsillä olevan keksinnön mukaista stabiilia, kiteistä entsyymiä sisältävää nestemäistä pesuainekoostumusta ja OPTICLEAN L-1000:a pidettiin 37 °C:ssa, kunnes niiden yksittäiset näytteet oli otettu eri ajankohtina (kuten taulukossa 3 on spesifioitu) ja proteaasin jäljellä oleva aktiivisuus mitattiin käyttämällä edellä kuvattua menettelytapaa ja US-patentin 5 256 557 esimerkissä 1 esitetyissä olosuhteissa.

Yhteenvedo näiden kokeiden tuloksista on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

Näyte- nro	Formulaation kuvaus	Proteaasiaktiivisuuden väheneminen, %	
		2 viikkoa	4 viikkoa
1	Nestemäinen entsyymi formuloituna propyleeniglykoliin (1 000 000 DU/g)	11	31
2	Kiteinen entsyymi formuloituna peruspesuainelietteeeseen (1 000 000 DU/g)	0	0

Merkittävä parannus alkalisia proteaasikiteitä sisältävien pesuaineformulaatioiden varastoinninkestävyydessä voi johtua siitä, että entsyymien kiteisen rakenteen säilyttäminen riittävän entsyymiä kiteyttävän aineen, eli NaCl:n riittävän määrän läsnä ollessa formulaatiossa (kiteisestä konsentraatissa).

Alkalisten proteaasikiteiden mikrosuodatettu konsentraatti sisälsi 10 % (w/v) natriumkloridia. Lietteinen pesuaineformulaatio, joka sisälsi 20 % (w/v) mikrosuodatettua alkalisten proteaasikiteiden konsentraattia, sisälsi 2 % (w/v) natriumkloridia, joka olisi voinut estää alkalisten proteaasikiteiden uudelleenliukenemisen varastoinnin aikana.

Esimerkki 5

Vedetön lietteinen pesuaineformulaatio (DOUBLE POWER SURF) saatiin ja sitä kuumakäsiteltiin (siinä olevan entsyymien inaktivoimiseksi), kuten edellä olevassa esimerkissä 4 on kuvattu.

Nestemäistä OPTICLEAN L-1000:a saatiin kuten esimerkissä 2 on kuvattu.

Stabiilia kiteistä entsyymiä sisältävää nestemäistä koostumusta, joka sisälsi 10 % (w/v) entsyymiä kiteyttävää ainetta (natriumkloridia) saatiin, kuten esimerkissä 1 on kuvattu.

99 grammaan pesuaineen lietealustaa lisättiin joko yksi gramma nestemäistä alkalista proteaasia (1 000 000 DU/g) tai yksi gramma stabiilia, kiteistä entsyymiä sisältävää nestemäistä koostumusta. Tuloksena saatuja vesipitoisia pesuaineformulaatioita sekoitettiin tasaisen pitoisuuden saavuttamiseksi. Alkuperäisen entsyymiaktiivisuuden tarkastamisen jälkeen näitä näytteitä säilytettiin 37 °C:ssa. Mittausnäytteitä otettiin tiettyinä aikoina (kuten taulukossa 4 on esitetty) ja niiden aktiivisuus mitattiin käyttämällä edellä kuvattua menettelytapaa ja

US-patentin 5 256 557 esimerkissä 1 esitetyissä olosuhteissa.

Yhteenvedo näiden kokeiden tuloksista on esitetty taulukossa 4.

5

Taulukko 4

10

Näyte- nro	Formulaation kuvaus	Proteaasiaktiivisuuden väheneminen, %	
		Viikkoja 37 °C:ssa	
		2 viikkoa	4 viikkoa
1	Nestemäinen entsyymi formuloituna peruspesu- ainelietteeseen	52	58
2	Kiteinen entsyymi for- muloituna peruspesuai- nelietteeseen	15	26

15

20

Taulukossa 4 esitetyt tulokset osoittivat, että entsyymin inaktivoituminen tapahtui nopeasti, kun alkalista proteaasia ei oltu stabiloitu natriumkloridilla. Entsyymiaktiivisuuden häviäminen lietteisessä pesuainealustassa, joka sisälsi alkalisia proteaasikiteitä, jotka oli yhdistetty natriumkloridikiteiden kanssa, on huomattavasti alhaisempi kuin aktiivisuuden häviäminen pesuainealustassa, joka sisälsi alkalisia proteaasikiteitä, joita ei oltu yhdistetty (stabiloitu) natriumkloridilla.

25

30

On huomattava, että taulukon 4 tulokset osoittavat, että lietteisissä pesuaineformulaatioissa käytetyn stabiloidun kiteisen entsyymin aktiivisuudessa oli häviöitä, ja uskotaan, että tämä hävikki voisi johtua lietteisessä pesuaineformulaatiossa olevien kiteiden hitaasta uudelleenliukenemisestä, joka johtuu natriumkloridin alhaisemmasta

35

pitoisuudesta formulaatiossa. Täten parannettu entsyymin stabiilisuus pesuaineformulaatiossa saavutettiin sisällyttämällä entsyymiä kiteisessä muodossa yhdessä entsyymiä kiteyttävän aineen sopivan pitoisuuden kanssa.

- 5 Käsillä olevan keksinnön mukaisiin stabiileihin, entsyymiä sisältäviin nestemäisiin koostumuksiin ja menetelmiin niiden valmistamiseksi voidaan tehdä modifikaatioita eroamatta käsillä olevan keksinnön perushengestä. Vastaavasti, kuten alan ammattilaiset ymmärtävät, voidaan
- 10 käsillä olevaa keksintöä, liitteenä olevien patenttivaatimusten piirissä, harjoittaa muutoinkin kuin tässä esite-tyissä spesifisissä esimerkeissä on kuvattu.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä stabiilin, entsyymiä sisältävän nestemäisen koostumuksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siittä, että entsyymi muodostetaan siten, että entsyymi on liukenemattomassa muodossaan ja yhdistetään nestemäisessä formulaatiossa liukenemattomassa muodossaan oleva entsyymi entsyymin liukenemattomassa muodossaan säilyttävän aineen kanssa, jolloin muodostuu entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siittä, että entsyymin muodostus liukenemattomaan muotoonsa käsittää entsyymin kiteyttämisen siten, että entsyymillä on kidemuoto.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siittä, että yhdistäminen nestemäisessä formulaatiossa käsittää kiteisen entsyymin yhdistämisen, nestemäisessä formulaatiossa, entsyymiä kiteyttävän aineen kanssa sellaisen entsyymin saamiseksi, joka on kiteisessä muodossaan, jolloin muodostuu stabiili, entsyymiä sisältävä nestemäinen formulaatio.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siittä, että kiteyttävä aine on natriumkloridi.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siittä, että entsyymi on proteaasi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siittä, että entsyymi on seriiniproteaasi.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siittä, että seriiniproteaasi on alkalinen proteaasi.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siittä, että nestemäinen formulaatio on vesipitoinen formulaatio, jonka avulla muodostetaan vesipitoinen koostumus.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nestemäinen formulaatio on pesuaineformulaatio.

5 10. Menetelmä stabiiliin, entsyymiä sisältävän vesipitoisen pesuainekoostumuksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kiteytetään entsyymi, jonka avulla annetaan käyttöön kiteisessä muodossa oleva entsyymi, ja kiteytetty entsyymi ja entsyymiä kiteyttävä aine yhdistetään vesipitoisessa pesuaineformulaatiossa entsyymin säilyttämiseksi kiteisessä muodossaan, jonka avulla muodostetaan stabiili, entsyymiä sisältävä vesipitoinen pesuainekoostumus.

15 11. Stabiili entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään yhtä entsyymiä, joka on liukenemattomassa muodossaan, ainetta, joka säilyttää entsyymin liukenemattomassa muodossaan ja nestemäistä formulaatiota, jossa liukenemattomassa muodossaan oleva entsyymi ja aine yhdistetään siten, että entsyymi on stabiili ja sen entsyymaattinen aktiivisuus säilyy.

20 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että liukenemattomassa muodossa oleva entsyymi on kiteinen entsyymi.

25 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että aine, joka säilyttää entsyymin liukenemattomassa muodossaan, on kiteytysaine.

30 14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että kiteytysaine on natriumkloridi.

15. Patenttivaatimuksen 11 mukainen stabiili, entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että entsyymi on proteaasi.

16. Patenttivaatimuksen 11 mukainen stabiili, entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että entsyymi on seriiniproteaasi.

5 17. Patenttivaatimuksen 11 mukainen stabiili, entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että seriiniproteaasi on alkalinen proteaasi.

18. Patenttivaatimuksen 11 mukainen stabiili, entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että nestemäinen formulaatio on vesipitoinen formulaatio, jonka avulla muodostetaan vesipitoinen koostumus.

19. Patenttivaatimuksen 11 mukainen stabiili, entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että nestemäinen formulaatio on pesuaineformulaatio, jonka avulla muodostetaan pesuainekoostumus.

15 20. Stabiili, entsyymiä sisältävä nestemäinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään yhtä kiteytynyttä entsyymiä, ainetta, joka säilyttää entsyymin kiteisessä muodossaan ja vesipitoista pesuaineformulaatiota, jossa kiteinen entsyymi ja aine yhdistetään siten, että entsyymi säilyy kiteisessä muodossaan ja sen entsyymaattinen aktiivisuus säilyy.