(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

219 852 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 96 00961
(22) A bejelentés napja: 1994. 10. 13.
(30) Elsőbbségi adatok:
08/136,626 1993. 10. 14. US
08/237,938 1994. 05. 02. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 94/11777
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 95/10592

(40) A közzététel napja: 1997. 09. 29.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2001. 08. 28.

(51) Int. Cl.[7]

C 11 D 3/386
A 61 K 7/48
C 12 N 15/57
C 11 D 3/39

(72) Feltalálók:
Barnett, Bobby Lee, Cincinnati, Ohio (US)
Brode, Philip Frederick, Cincinnati, Ohio (US)
Burns, Michael Eugene, West Chester, Ohio (US)
Digiulio, David Neil, Cincinnati, Ohio (US)
Getty, Edward Eugene, Cincinnati, Ohio (US)
Ghosh, Chancal Kumar, West Chester, Ohio (US)
Hartshorn, Richard Timothy, Newcastle upon Tyne, Tyne and Wear (GB)
Rubingh, Donn Nelton, Cincinnati, Ohio (US)
Willey, Alan David, Cincinnati, Ohio (US)

(73) Szabadalmas:
The Procter and Gamble Company, Cincinnati, Ohio (US)

(74) Képviselő:
dr. Láng Tivadarné, S. B. G. & K. Budapest Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) Proteázenzimeket tartalmazó fehérítőkészítmények

KIVONAT

A találmány tárgyát fehérítőkészítmények, különösen mosószerek, és olyan eljárások képezik, amelyek egy vagy több proteázenzimet és egy vagy több fehérítőszerrel, különösen fehérítőaktivátorokkal rendelkező fehérítőrendszert tartalmaznak.

A nevezett proteázenzim a természetben fel nem lelhető aminosavszekvenciával rendelkező karbonil-hidroláz-változat, amely egy szubtilizin, előnyösen *Bacillus* szubtilizin prekurzor karbonil-hidrolázból származik helyettesítve a prekurzor karbonil-hidrolázban a +76. helyzetű aminosavmaradékot és egy vagy több aminosavmaradékot a +27., +99., +101., +103., +104., +105., +107., +109., +123., +126., +128., +135., +156., +166., +195., +197., +204., +206., +210., +216., +217., +218., +222., +260., +265. és/vagy +274. helyzetben, melyek ekvivalens helyzetűek a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin aminosavmaradékaival.

A fehérítőszer szerves peroxisav vagy fehérítőaktivátor és az aktivátorral reakcióba lépő, hidrogén-peroxid fejlesztésére képes peroxidvegyület olyan kombinációja, amely *in situ* szerves peroxisavat képez a készítményből keletkező fehérítőoldatban.

HU 219 852 B

A találmány tárgyát fehérítőkészítmények, különösen mosószerek, és olyan módszerek képezik, amelyek egy vagy több, karbonil-hidroláz-változat proteázenzimet és egy vagy több fehérítőszerrel, különösen fehérítőaktivátorokkal rendelkező fehérítőrendszert használnak.

Különböző típusú enzimeket hagyományosan már régóta használnak mosószerekben bizonyos foltok eltávolításának elősegítésére szövetekből. Ezek a foltok tipikusan lipid- és fehérjeszennyeződésekkel kapcsolatosak. Az enzimek azonban kevésbé bizonyultak hatásosnak a szennyeződések és foltok más típusaival szemben.

Az is régóta ismert, hogy peroxid fehérítők hatásosak folt és/vagy szennyeződés szövetekből történő eltávolítására, az ilyen fehérítők azonban hőmérsékletfüggőek. 60 °C-os mosóvíz-hőmérsékleten a peroxid fehérítők csak részben hatásosak. Amint a mosóvíz hőmérséklete 60 °C alá csökken, peroxid fehérítők relatív hatástalanná válnak. Ezért jelentős mennyiségű ipari kutatás történt hatásos fehérítőrendszerek kifejlesztésére.

A találmány segítségével feltártuk, hogy új proteázenzimek – amelyek karbonil-hidroláz-változatok – és fehérítőszerek – különösen fehérítőaktivátorok – kombinációja hatásos folteltávolítási és/vagy piszokeltávolítási előnyöket nyújt. Ezért a találmány tárgyát olyan fehérítőkészítmények, különösen mosószerkészítmények szolgáltatása képezi, amelyek javított folteltávolítási és/vagy piszokeltávolítási előnyökkel és/vagy szövettisztító előnyökkel és/vagy fehérítősajátságokkal rendelkeznek.

A találmánynak ezek és más tárgyai nyilvánvalóvá válnak az itt következő részletes leírásból.

Az EP–A 405,901 számú közrebocsátási iratban olyan mutáns szubtilizinvariánsokat tartalmazó detergens kompozíciókat ismertetnek megnövelt mosóhatással, melyek egyszeres vagy többszörös helyettesítéseket, deléciókat vagy inszerciókat tartalmaznak.

Az 1987. január 6-án megadott 4,634,551 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Burns és munkatársai) közzétesz amido-peroxisav fehérítővegyületeket és azok prekurzorait, amelyeket felhasználunk a jelen találmányban. Lásd még az 1989. augusztus 1-jén megadott 4,852,989 (Burns és munkatársai) számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást. Az 1991. december 3-án megadott 5,069,809 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Lagerwaard és munkatársai) NOBS fehérítőaktivátoroknak LIPOLASE lipázenzimekkel való kombinációját hozza nyilvánosságra. Lásd az 1989. november 15-én közzétett 341,947 számú európai szabadalmi leírást (Lagerwaard és munkatársai) lipázenzimeknek bizonyos fehérítőrendszerekkel szembeni összeférhetőségi problémája kifejtésére. Az 1985. október 8-án megadott 4,545,784 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Sanderson) bemutatja aktivátorok nátrium-perborátra történő abszorpcióját.

A jelen találmány tárgyát olyan fehérítőkészítmények képezik, amelyek tartalmaznak:

a) hatásos mennyiségű proteázenzimet – karbonil-hidroláz-változatot – amely olyan, a természetben nem található aminosavszekvenciával rendelkezik, amely egy szubtilizin prekurzor karbonil-hidroláz aminosavmaradékainak különböző aminosavakkal történő helyettesítéséből származik, ahol a helyettesített nevezett aminosavmaradékok a prekurzor enzimben megfelelnek a +76. helyzetnek a következő egy vagy több maradékkal kombinálva: +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 és/vagy +274, ahol a számozott helyek megfelelnek a természetben előforduló, *Bacillus amyloliquefaciens*ből származó szubtilizinnek vagy más karbonil-hidrolázok vagy szubtilizinek (úgymint *Bacillus lentus* szubtilizin) egyenértékű aminosavmaradékainak; és

b) fehérítőszert, amely vagy szerves peroxisav, vagy fehérítőaktivátor és az aktivátorral reakcióba lépő hidrogén-peroxid fejlesztésére képes peroxidvegyület olyan kombinációja, amely *in situ* szerves peroxisavat alkot a készítményből képződött fehérítőoldatban; és

c) egy vagy több tisztítószeranyagot, amelyek összeegyeztethetőek a proteázenzimmel és fehérítőszerrel.

A találmány felölel szövetek tisztítására szolgáló módszert is, amely magában foglalja a nevezett szövetek érintkeztetését – előnyösen keveréssel – a nevezett fehérítőkészítményeket tartalmazó vizes folyadékkal. A módszer elvégezhető körülbelül 60 °C alatti hőmérsékleteken, de természetesen meglehetősen hatékony egészen forrásig terjedő mosási hőmérsékleteken. A vizes mosófolyadék hagyományos detergens összetevőknek előnyösen legalább körülbelül 300 ppm-ét ugyanúgy tartalmazza, mint legalább körülbelül 25 ppm fehérítőaktivátort és legalább körülbelül 25 ppm fehérítővegyületet. A nevezett vizes folyadék előnyösen a hagyományos detergens összetevőknek 900–20 000 ppm-ét, 100–25 000 ppm fehérítővegyületet és 100–2500 ppm nevezett fehérítőaktivátort tartalmaz.

A nevezett módszerben alkalmazott hagyományos detergens összetevők, 1–99,8%, előnyösen 5–80% felületaktív anyagot tartalmaznak. Adott esetben a detergens készítmények 5–80% mosószerépítőt is tartalmazhatnak. Egyéb szabadon választható detergens összetevőket szintén felölelnek a találmány tárgyát képező, teljesen elkészített detergens/fehérítő készítmények.

Minden százalék, arány és hányad tömegre vonatkozik, ha másképp nem adjuk meg.

Az ábrák rövid leírása

Az 1A–C. ábrák a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin DNS- és aminosavszekvenciáját és ennek a génnek (6. számú szekvenciavázlat) részleges restrikciós térképét mutatják.

A 2. ábra a *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN)' és *Bacillus lentus* (vad típus) szubtilizinek körében előforduló konzervatív aminosavmaradékokat mutatja.

A 3A. és 3B. ábrák négy szubtilizin aminosavszekvenciáját mutatják. A felső vonal a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin (időnként szubtilizin BPN'-ként említve) aminosavszekvenciáját (7. számú szekvenciavázlat) tünteti fel. A második vonal mutatja a *Bacillus subtilis* szubtilizin aminosavszekvenciáját (8. számú szekvenciavázlat). A harmadik vonal ábrázolja a *Bacillus licheniformis* szubtilizin aminosavszekvenciáját (9.

számú szekvenciavázlat). A negyedik vonal a *Bacillus lentus* szubtilizin (szubtilizin 309-ként is említve a WO 89/06276 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben) aminosavszekvenciáját (10. számú szekvenciavázlat) mutatja. A * jel specifikus aminosavmaradék hiányát jelenti a szubtilizin BPN'-hez képest.

A 4. ábra a GGA274 plazmid szerkesztését mutatja.

Az 5. ábra a GGT274 szerkesztését mutatja, amely az ebben a bejelentésben alkalmazott bizonyos expressziós plazmidok köztiterméke.

A 6A. és 6B. ábrák a *Bacillus lentus* szubtilizin DNS- (11. számú szekvenciavázlat) és aminosavszekvenciáját mutatják. Az érett szubtilizinfehérjét az alaninnak megfelelő GCG (334–336.) kodonnal kezdődő kodonok kódolják.

A 7A. és 7B. ábrák mutatják a találmány előnyös megvalósítási formájának (N76D/S103A/V104I) DNS- és aminosavszekvenciáját (12. számú szekvenciavázlat). Az ezen az ábrán levő DNS-t a leírt módszerekkel úgy módosítottuk, hogy a 76. helyzetben aszparaginsavat, a 103. helyzetben alanint és a 104. helyen izoleucint kódoljon. Az érett szubtilizinfehérje-változatot az alaninnak megfelelő GCG (334–336.) kodonnal kezdődő kodonok kódolják.

A 8A. és 8B. ábrák a pBCDAICAT vektor szerkesztését mutatják.

A 9A. és 9B. ábrák a pUCCATFNA vektor szerkesztését mutatják.

A találmányban alkalmazott fehérítőkészítmények szövetek hatásos és eredményes tisztítását nyújtják, amelynek révén eltávolítják a foltokat és/vagy szennyeződéseket a szövetekből. A fehérítőrendszerek a proteázenzimmel kombinálva különösen hatásosak a legtöbb szennyeződésnek a szövetekből történő eltávolításánál, beleértve fehérje- és lipidszennyeződéseket, makacs és nehéz szennyeződéseket, különösen nukleofil és testi szennyeket.

Az itt használható proteázenzimeket, fehérítőszereket (beleértve peroxisavakat és fehérítőrendszereket) és tisztítószeranyagokat – beleértve az előnyös mennyiségeket – részletesen leírjuk a következőkben.

1. Fehérítőszer

Az itt használt fehérítőkészítmények olyan fehérítőszert tartalmaznak, amely a készítménynek előnyösen 0,5–20%-át teszi ki (tömegszázalékban). A fehérítőszer vagy lényegében oldhatatlan, előnyösen szilárd szerves peroxisav, vagy hidrogén-peroxid fejlesztésére képes fehérítőaktivátort és peroxid fehérítővegyületet tartalmazó fehérítőrendszer, vagy a kettő kombinációja. A készítményben levő, vagy az aktivátor és a peroxidvegyület kombinációjával képződő persavnak előnyösen van egy megfelelő karbonsava, amely 3–6,5 közé eső hidrofil-lipofil egyensúlyi értékkel (Hydrophilic-Lipophilic Balance =„H. L. B.") rendelkezik. Ezért a jelen találmányban felhasználható, előnyben részesített peroxisavak jellemzésére a Davies által leírt „H. L. B. skála"-módszer [Davies J. T., Proc. 2nd Internat. Congr. Surface Activity 1, 426 Butterworths, London (1957)] alkalmazható, amelyet itt referenciaként beépítettünk. Ilyen H. L. B. skálát használtunk felületaktív anyagok vizsgálatánál eszközként a felületaktív anyagnak a hidrofil (vízkedvelő) és lipofil (olajkedvelő) fázisok közötti megoszlására vonatkozóan. Ilyen módon a H. L. B. értékek felhasználhatók az aktívfehérítő-fajta lipofil (hidrofil) sajátságának (azaz a peroxisavnak a mosófolyadékból történő kiválási és a piszokfolt/szövet határfelületen történő koncentrálódási képessége) jelzésére a mosásnál.

Az itt következő A táblázatban olyan H. L. B. értékeket teszünk közzé, amelyeket válogatott peroxisavakra (mint megfelelő karbonsavakra) számítottunk ki. A H. L. B. értékek kiszámítására alkalmazott egyenlet a következőképpen írható fel:

H. L. B.=(hidrofil csoportok számának összege)–(hidrofób csoportok számának összege)+7.

A hidrofil csoportok számának értékei [–C(O)OH és –N(H)C(O)–=2,1] és a hidrofób csoportok számának értékei (alifás/aromás szén=0,475 és a poláris csoportok közötti alifás szénatomok a szénhidrogénláncban levő alifás szénnek 1/2 értékét teszik ki=0,475/2). Tájékoztatásként a H. L. B.<7 érték azt jelzi, hogy az anyag előnyösen vízoldható és a H. L. B.>7 érték növekvő felületi aktivitást és hidrofób jelleget jelez.

A táblázat

Különböző peroxisavak által nyújtott H. L. B. értékek

Aktivátor/először képződött peroxisav	Rövidítés*	Peroxisav	Megfelelő karbonsav H. L. B.
Tetraacetil-etilén-diamin	TAED	$CH_3C(O)OOH$	8,6
Diperoxi-dodekándisav	DPDDA*	$HOO(O)C(CH_2)_{10}–C(O)OOH$	6,5
Peroxi-borostyánkősav-nonilamid	NAPSA*	$CH_3(CH_2)_8N(H)–C(O)–(CH_2)_2–C(O)OOH$	6,4
(Benzoil-oxi)-benzolszulfonát	BOBS	$C_6H_5C(O)OOH$	6,3
Peroxi-adipinsav-nonilamid	NAPAA*	$CH_3(CH_2)_8N(H)–C(O)–(CH_2)_4C(O)OOH$	6,0
(Nonanoil-oxi)-benzolszulfonát	NOBS	$CH_3(CH_2)_7C(O)–OOH$	5,3
(Dekanoil-oxi)-benzolszulfonát	DOBS	$CH_3(CH_2)_8C(O)–OOH$	4,8
Perlaurilsav	PLA*	$CH_3(CH_2)_{10}C(O)OOH$	3,9

* A rövidítések az angol elnevezésekből adódnak:

DPDDA*=DiPeroxyDodecane Dioic Acid.

NAPSA*=Nonyl Amide of Peroxy Succinic Acid.

NAPAA*=Nonyl Amide of Peroxy Adipic Acid.

PLA*=PerLauric Acid.

Ahogyan az előzőekben megjegyeztük, a találmány szerinti peroxisavak (közvetlenül adott vagy *in situ* előállítottak) előnyben részesített H. L. B. értékei (a megfelelő karbonsavaké) körülbelül 3,0–6,5 értékek közé esnek. A találmányban felhasználható peroxisavakra (közvetlenül adott vagy *in situ* előállítottakra) még inkább előnyben részesített H. L. B. értékek (mint karbonsavak) 4,0–6,5. A találmányban felhasználható peroxisavakra (közvetlenül adott vagy *in situ* előállítottakra) leginkább előnyben részesített H. L. B. értékek (mint karbonsavak) 4,0–6,0.

a) *Peroxisav*

A találmány olyan detergens készítményeket ölel fel, amelyek a proteázenzim hatásos mennyiségét és legalább 0,1%, előnyösen 0,1–50% (tömegszázalék) lényegében oldhatatlan peroxisavtartalmú fehérítőrendszert tartalmaznak. Az itt felhasználható peroxisav a készítménynek előnyösen 0,5–20%-át, még előnyösebben 1–10%-át, legelőnyösebben 2–7%-át (tömegszázalék) teszi ki.

Előnyös szerves peroxisavakat a 4-(nonil-amino)-4-oxo-peroxi-vajsavat; 6-(nonil-amino)-6-oxo-peroxi-kapronsavat; 1,12-diperoxi-dodekándisavat; heptilszulfonil-peroxi-propionsavat; decilszulfonil-peroxi-propionsavat; és heptil-, oktil-, nonil-, decilszulfonil-peroxi-vajsavat és ezek keverékeit tartalmazó csoportból választunk ki.

A szerves peroxisavak közül amido-peroxisavakat (amiddal szubsztituált peroxi-karbonsavakat) részesítünk előnyben. Felhasználásra alkalmas amido-peroxisavakat írnak le külön-külön az 1987. január 6-án megadott 4,634,551 számú és augusztus 11-én megadott 4,686,063 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások (mindkettő Burns és munkatársaitól), mindkettőt beépítettük referenciaként. Megfelelő amido-peroxisavak az (I) és (II) általános képlettel rendelkeznek, ahol R^1 1–14 szénatomot tartalmazó alkil-, aril- vagy alkarilcsoport (R^1 előnyösen 6–12 szénatomot tartalmazó alkilcsoport), R^2 1–14 szénatomot tartalmazó alkilén-, arilén- vagy alkariléncsoport (R^2 előnyösen 6–12 szénatomot tartalmazó alkiléncsoport) és R^5 H vagy 1–10 szénatomot tartalmazó alkil-, aril- vagy alkarilcsoport (R^5 előnyösen H). R^1 még előnyösebben 8–10 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, és R^2 2–4 szénatomot tartalmazó alkiléncsoport.

A találmányban való felhasználásra szintén alkalmasak a peroxi-fumarátok, amelyeket Burns és munkatársai az 1989. augusztus 1-jén megadott 4,852,989 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban írnak le, és itt beépítettünk referenciaként, és peroxi-szulfonsavak (szulfonált peroxi-karbonsavak), amelyeket Dryoff és munkatársai az 1988. július 19-én megadott 4,758,369 számú, az 1989. április 25-én megadott 4,824,591 számú és 1991. április 2-án megadott 5,004,558 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban írnak le és itt beépítettünk referenciaként.

A 4,686,063 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás 1. példája 8. oszlopának 40. sorától a 9. oszlop 5. soráig NAPSA, 9. oszlopának 15. sorától a 9. oszlop 65. soráig NAPAA szintézisének leírását tartalmazza. Az amido-peroxisav-szintézis végén a reakciót vízzel fojtottuk el, szűrtük, vízzel mostuk a kénsav (vagy más, a peroxisav előállításához használt erős sav) feleslegének eltávolítása céljából, és újból szűrtük.

Az így kapott amido-peroxisav nedves pogácsa érintkezésbe hozható pH 3,5–6 közötti, előnyösen 4–5 közötti foszfátpufferrel az 1990. március 20-án megadott 4,909,953 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint (Sadlowski et al.), amelyet ide referenciaként beépítettünk.

A tárolási stabilizálás vagy exoterm kontroll céljából egyéb hatóanyagok adhatók az amido-peroxisavhoz a végső termékbe történő beépítés előtt. Például bórsav, exoterm kontrollreagens – amelyet az 1987. augusztus 11-én megadott 4,686,063 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Burns és munkatársai) tesz közzé és beépítettünk ide – keverhető az amido-peroxisavval (amelyet már mostunk foszfátpufferrel) körülbelül 2:1 persav:bórsav arányban. A foszfátpufferrel mosott amido-peroxisav keverhető megfelelő mennyiségű dipikolinsav és tetranátrium-pirofoszfát kelátképző stabilizáló-rendszerrel is. Adott esetben a kelátképzők már benne lehetnek a foszfátpufferben mielőtt az érintkezne a nedves pogácsával.

A nedves pogácsa előnyösen 0,1–260 μm, előnyösebben 10–100 μm és legelőnyösebben 30–60 μm átlagos átmérőjű részecskékből áll. Kis részecskeméretű NAPAA-kristályok kívánatosak itt. Lásd az 1991. október 8-án megadott 5,055,218 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást (Getty et al.), amelyet itt referenciaként beépítettünk.

A NAPAA szűrt pogácsát itt előnyösen kétszer mossuk foszfátpufferben. Azt találtuk, hogy két egymást követő foszfátpufferes mosás a NAPAA optimális stabilitásához vezet.

Szemcsés (szilárd) szerves peroxisavak közül előnyösen 3–12, előnyösebben 5–7 közötti elméleti AvO-(AvO=available oxygen=felhasználható oxigén) értékkel rendelkezőket részesítünk előnyben.

Itt leginkább NAPAA alkalmazását részesítjük előnyben. A peroxi-adipinsav-nonilamid *(n*onyl*a*mide of *p*er-oxy*a*dipic *a*cid=NAPAA) másik elnevezése 6-(nonil-amino)-6-oxo-peroxi-kapronsav. A NAPAA képlete (A), molekulatömege 287,4.

NAPAA-t tartalmazó detergens készítmények és fehérítőkészítmények a textilek felületének rendkívül hatékony és eredményes fehérítését nyújtják. A foltokat és/vagy szennyeződéseket eltávolítják a textilekből. Ezek a készítmények különösen hatékonyak makacs szennyeződéseknek textilekből történő eltávolításában.

A NAPAA poláros amid vagy szubsztituált amid része olyan peroxisavat eredményez, amelynek nagyon alacsony a gőznyomása és így ugyanúgy alacsony illatprofillal, mint kiváló fehérítőteljesítménnyel rendelkezik. Úgy gondoljuk, hogy az amidcsoport polaritása a peroxisav gőznyomásának csökkenését és az olvadáspont emelkedését eredményezi.

NAPAA közvetlenül felhasználható fehérítőszerként. Csökkent gőznyomással és jó illatprofillal rendelkezik mosodai alkalmazásokhoz.

NAPAA előállítható például NAAA (nonyl amid of adipic acid=adipinsav-nonilamid) kénsavval és hidrogén-peroxiddal való reakciójával. A reakció termékét jeges víz hozzáadásával fojtjuk el, amelyet szűrés, desztillált vizes mosás és végső szívatásos szűrés követ a nedves pogácsa kinyeréséhez. A mosás addig folytatható, amíg a szűrlet pH-ja semleges nem lesz.

Azt is előnyben részesítjük, hogy a NAPAA pH-ja (10% szilárd anyag vízben) 4,2–4,8 között legyen. Meglepő módon ez a pH nagyobb hőstabilitású részecskéket eredményez.

b) *Fehérítőrendszerek*

Fehérítőaktivátor és peroxid fehérítővegyület

Fehérítőaktivátorok

Az itt használható fehérítőrendszerekhez való fehérítőaktivátor előnyösen a (III) általános képlettel rendelkezik, ahol R 5–18 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, ahol a leghosszabb lineáris alkillánc a karbonil szénatomtól terjedően és azt is beleértve 6–10 szénatomot tartalmaz, és L olyan konjugálósav leválócsoportja, amely 4–13, előnyösen 6–11, legelőnyösebben 8–11 pKa-értékkel rendelkezik.

L alapvetően bármilyen alkalmas leválócsoport lehet. A leválócsoport bármilyen olyan csoport, amely kiszorul a fehérítőaktivátorból a fehérítőaktivátoron a perhidroxidanion által létrehozott nukleofil támadás következtében. Ez a perhidrolízisreakció a perkarbonsav képződését eredményezi. Általában arra a csoportra, amely megfelelő leválócsoport, elektronvonzó hatást kell gyakorolni. Ez elősegíti a perhidroxidanion nukleofil támadását.

Az L csoportnak elég reaktívnak kell lennie a reakcióhoz, hogy az optimális időkereten belül megtörténjen (például mosási ciklus). Ha azonban L túl reaktív, ezt az aktivátort nehéz lesz stabilizálni. Ezeket a tulajdonságokat általában összeegyeztetjük a leválócsoport konjugálósavjának pKa-értékével, jóllehet ismeretesek kivételek e szokás alól.

Előnyben részesített fehérítőaktivátorok (N) és (V) általános képletűek, ahol R^1 6–12 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, R^2 1–6 szénatomot tartalmazó alkilén-csoport, R^5 H vagy 1–10 szénatomot tartalmazó alkil-, aril- vagy alkarilcsoport és L-t az (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (j) és (k) általános képletű csoportok közül választjuk ki, ahol R^6 1–14 szénatomot tartalmazó alkilén-, arilén- vagy alkariléncsoport, R^3 1–8 szénatomot tartalmazó alkillánc, R^4 H vagy R^3 és Y H vagy egy oldhatóságot biztosító csoport. Y-t előnyösen a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: $-SO_3^-M^+$, $-COO^-M^+$, $-SO_4^-M^+$, $-N^+(R'_3)X^-$ és $O\leftarrow N(R'_3)$, ahol R' 1–4 szénatomot tartalmazó alkillánc, M egy kation, amely oldhatóságot biztosít a fehérítőaktivátornak és X egy anion, amely oldhatóságot biztosít a fehérítőaktivátornak. M előnyösen egy alkálifém-, ammónium- vagy legelőnyösebben nátriummal és káliummal szubsztituált ammóniumkation, és X egy anion a halid-, hidroxid-, metil-szulfát- és acetátanionokat tartalmazó csoportból kiválasztva. Y még előnyösebben $-SO_3^-M^+$ és $-COO^-M^+$. Figyelembe kell venni, hogy olyan leválócsoporttal rendelkező fehérítőaktivátorokat, amelyek nem tartalmaznak oldhatóságot biztosító csoportot, jól el kell oszlatni a fehérítőoldatban annak érdekében, hogy oldódásukat elősegítsük. Előnyben részesítjük az (a) általános képletű csoportot, ahol R^3 a fentiek szerint definiált és Y $-SO_3^-M^+$ vagy $-COO^-M^+$, ahol M a fentiek szerint definiált.

Különösen előnyben részesített fehérítőaktivátorok azok, amelyekben R^1 6–12 szénatomot tartalmazó lineáris alkillánc, R^2 2–6 szénatomot tartalmazó lineáris alkilénlánc, R^5 H, és L-t az (a), (b) és (c) általános képletű csoportok közül választjuk ki, ahol R^3 a fentiek szerint definiált, Y $-SO_3^-M^+$ vagy $-COO^-M^+$ és M a fentiek szerint definiált.

Előnyben részesített fehérítőaktivátor a (VI) általános képletű vegyület, amelyben R H, alkil-, aril- vagy alkarilcsoport. Ezt Hodge és munkatársai írták le a 4,966,723 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amelyet itt referenciaként beépítettünk.

Előnyben részesített fehérítőaktivátorok a (VII) és (VIII) általános képletű vegyületek, ahol R^1 H vagy 1–6 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, R^2 1–6 szénatomot tartalmazó alkilcsoport és L a fentiek szerint definiált.

Előnyben részesített fehérítőaktivátorok azok a fenti általános képlettel rendelkező vegyületek is, ahol L az általános képlet szerint definiált, és R^1 H vagy 1–4 szénatomot tartalmazó alkilcsoport.

Még inkább előnyben részesített fehérítőaktivátorok a fenti általános képlettel rendelkező vegyületek, ahol L az általános képlet szerint definiált, és R^1 H.

Még jobban előnyben részesített fehérítőaktivátorok azok a fenti általános képlettel rendelkező vegyületek, ahol R 5–9, előnyösen 6–8 szénatomot tartalmazó lineáris alkillánc és L-t az (l), (m), (n), (c), (o), (p) és (q) általános képletű csoportok közül választjuk ki, ahol R, R^2, R^3 és Y a fentiek szerint definiált.

Különösen előnyben részesített fehérítőaktivátorok azok a fenti általános képlettel rendelkező vegyületek, ahol R 5–12 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, amelyben az alkillánc leghosszabb lineáris része a karbonil széntől kiindulva és azt is beleértve 6–10 szénatom, és L-t a (c), (n) és (m) csoportok közül választjuk ki, ahol R^2 1–8 szénatomot tartalmazó alkillánc, és Y $-SO_3^-M^+$ vagy $-COO^-M^+$, ahol M alkálifém-, ammónium- vagy szubsztituált ammóniumkation.

Különösen előnyben részesített fehérítőaktivátorok azok a fenti általános képlettel rendelkező vegyületek, ahol R 5–9 és előnyösen 6–8 szénatomot tartalmazó lineáris alkillánc, és L-t a (c), (n) és (m) csoportok közül választjuk ki, ahol R^2 a fentiek szerint definiált és Y $-SO_3^-M^+$ vagy $-COO^-M^+$, ahol M a fentiek szerint definiált.

A leginkább előnyben részesített fehérítőaktivátor a (IX) általános képletű vegyület, amelyben R 5–9 és előnyösen 6–8 szénatomot tartalmazó lineáris alkillánc, és M nátrium vagy kálium.

Az itt alkalmazott fehérítőaktivátor előnyösen nonanoil-oxi-benzolszulfonsav nátriumsója (NOBS=*n*onanoyl*ox*y*b*enzene*s*ulfonate) vagy (benzoil-oxi)-benzolszulfonsav nátriumsója (BOBS=*b*enzoyl*ox*y*b*enzene*s*ulfonate).

A találmány fehérítőkészítményeiben történő felhasználásra továbbá különösen előnyben részesítjük a következő fehérítőaktivátorokat, amelyek különösen biztonságosak természetesgumi-részeket tartalmazó gépekkel történő alkalmazásra. Ezt annak tulajdonítjuk, hogy ezeknek az amidosavszármazék fehérítőaktivátoroknak a perhidrolízisreakciója során nem képződnek olajos diacil-peroxidok (DAP=diacylperoxide), hanem inkább oldhatatlan kristályos szilárd DAP-k. Ezekről a szilárd anyagokról feltételezzük, hogy nem képeznek bevonófilmet, és így a természetesgumi-részek nincsenek huzamosabb ideig kitéve DAP hatásának. Ezeket az előnyben részesített fehérítőaktivátorokat a következőket tartalmazó csoportból választjuk:

(i), (X) és (XI) általános képletű fehérítőaktivátorok vagy ezek keverékei, ahol R^1 1–14 szénatomot tartalmazó alkil-, aril- vagy alkarilcsoport, R^2 1–14 szénatomot tartalmazó alkilén-, arilén- vagy alkariléncsoport, R^5 H vagy 1–10 szénatomot tartalmazó alkil-, aril- vagy alkarilcsoport és L egy leválócsoport;

(ii) (XII) általános képletű benzoxazin típusú fehérítőaktivátorok, ahol R^1 H, alkil-, alkaril-, aril-, aril-alkil-csoport, és ahol R^2, R^3, R^4 és R^5 lehet ugyanaz vagy különböző szubsztituens a H, halogén, alkil-, alkenil-, aril-, hidroxil-, alkoxil-, amino-, alkil-amino-, $-COOR^6$ (ahol R^6 H vagy alkilcsoport) és karbonil funkciós csoportok közül;

(iii) (XIII) általános képletű N-acil-kaprolaktám fehérítőaktivátorok, ahol R^6 H vagy 1–12 szénatomot tartalmazó alkil-, aril-, alkoxi-aril- vagy alkarilcsoport; és

(iv) (i)–(iii) keverékei.

Előnyben részesített fehérítőaktivátorok az (i) típusból azok, amelyekben R^1 6–12 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, R^2 1–8 szénatomot tartalmaz, és R^5 H vagy metilcsoport. Különösen előnyben részesített fehérítőaktivátorok azok a fenti általános képletekkel rendelkező vegyületek, ahol R^1 7–10 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, és R^2 4–5 szénatomot tartalmaz.

Előnyben részesített fehérítőaktivátorok az (ii) típusból azok, amelyekben R^2 R^3 R^4 és R^5 H és R^1 fenilcsoport.

A nevezett (iii) típusú N-acil-kaprolaktám fehérítőaktivátorok előnyben részesített acilrészei R^6–CO– általános képletűek, ahol R^6 H vagy 1–12 szénatomot, előnyösen 6–12 szénatomot tartalmazó alkil-, aril-, alkoxi-aril- vagy alkarilcsoport. Felettébb előnyben részesített megvalósítási formáknál R^6-ot a fenil-, heptil-, oktil-, nonil-, 2,4,4-trimetil-pentil-, decenilcsoport tagjai és ezek keverékei közül választjuk ki.

– *Amidoszármazék fehérítőaktivátorok* – A találmányban alkalmazott (i) típusú fehérítőaktivátorok a (X) és (XI) általános képletű vegyületek amiddal szubsztituált változatai vagy ezek keverékei, ahol R^1, R^2 és R^5 a fentiek szerint definiált, és L lényegében bármilyen megfelelő leválócsoport lehet. Előnyben részesített fehérítőaktivátorok azok a fenti általános képlettel rendelkező vegyületek, ahol R^1, R^2 és R^5 a peroxisavra definiáltak szerinti és L-t a következőket tartalmazó csoportok és azok keverékei közül választjuk ki: (a), (b), (c), (t), (elu), (u), (v), (w), (x), (y), (z), (aa) és (ab), ahol R^1 1–14 szénatomot tartalmazó alkil-, aril- vagy alkarilcsoport, R^3 1–8 szénatomot tartalmazó alkillánc, R^4 H vagy R^3, és Y H vagy oldhatóságot biztosító csoport.

Az előnyben részesített oldhatóságot biztosító csoportok $-SO_3^-M^+$, $-COO^-M^+$, $-SO_4^-M^+$, $-N^+(R^3)_4X^-$ és $O\leftarrow N(R^3)_3$, és leginkább előnyben részesített az $-SO_3^-M^+$ és $-COO^-M^+$, ahol R^3 1–4 szénatomot tartalmazó alkillánc, M egy kation, amely oldhatóságot biztosít a fehérítőaktivátornak és X egy anion, amely oldhatóságot biztosít a fehérítőaktivátornak. M előnyösen egy alkálifém-, ammónium- vagy legelőnyösebben nátriummal és káliummal szubsztituált ammóniumkation, és X egy haloid-, hidroxid-metil-szulfát- vagy acetátanion. Figyelembe kell venni, hogy olyan leválócsoporttal rendelkező fehérítőaktivátorokat, amelyek nem tartalmaznak oldhatóságot biztosító csoportot, jól el kell oszlatni a fehérítőoldatban annak érdekében, hogy oldódásukat elősegítsük.

Előnyben részesített fehérítőaktivátorok azok a fenti általános képlettel rendelkező vegyületek, amelyben L-t az (a), (b) és (c) csoportok közül választjuk ki, ahol R^3 a fentiek szerint definiált, és Y $-SO_3^-M^+$ vagy $-COO^-M^+$, ahol M a fentiek szerint definiált.

A fehérítőaktivátorok egy másik fontos csoportja – beleértve az (i) és (ii) típusúakat – az itt leírtak szerint persavakat szolgáltat a gyűrű karbonil szénatomján a perhidroxidanion által kiváltott nukleofil támadás következményeként létrejövő gyűrűnyitással. Ez a gyűrűt felnyitó reakció például az (iii) típusú aktivátoroknál magában foglalja a hidrogén-peroxidnak vagy anionjának támadását a kaprolaktám gyűrűs karbonilján. Mivel hidrogén-peroxidnak vagy anionjának a támadása acil-kaprolaktámon előnyben részesíti a gyűrűn kívüli karbonilt, jelentős nyílt gyűrűs frakció nyeréséhez szükség lehet katalizátorra. Egy másik példát találhatunk felnyíló gyűrűs fehérítőaktivátorokra az (ii) típusú aktivátoroknál, ahogyan azt Hodge és munkatársai az 1990. október 30-án megadott 4,966,723 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban közzétették.

– *Benzoxazin típusú fehérítőaktivátorok* – Az ilyen Hodge által közzétett aktivátorvegyületek a (XIV) általános képlettel rendelkező benzoxazin típusú aktivátorokat – beleértve a (XV) általános képletű szubsztituált benzoxazinokat – ölelik fel, amelyekben R^1 H, alkil-, alkaril-, aril-, aril-alkil-csoport, és amelyben R^2, R^3, R^4 és R^5 lehet azonos vagy különböző szubsztituens a H, haloid-, alkil-, alkenil-, aril-, hidroxil-, alkoxil-, amino-, alkil-amino-csoport, $-COOR^6$ (ahol R^6 H vagy alkilcsoport) és karbonil funkciós csoportok közül választva.

Előnyben részesített benzoxazin típusú aktivátor a (XVI) képletű vegyület.

Ha aktivátorokat alkalmazunk optimális felszíni fehérítőteljesítményt kapunk olyan mosóoldatokkal, ahol az ilyen oldat pH-ja 8,5 és 10,5 közé esik és előnyösen 9,5 és 10,5 között van a perhidrolízisreakció elősegítése céljából. Ilyen pH előállítható olyan vegyületekkel, amelyek általánosan pufferekként ismeretesek, amelyek szabadon választható komponensei az itt leírt fehérítőrendszereknek.

– *N-acil-kaprolaktám fehérítőaktivátorok* – A találmányban alkalmazott (iii) típusú N-acil-kaprolaktám fehérítőaktivátorok a (XIII) általános képlettel rendelkeznek, ahol R^6 H vagy 1–12 szénatomot tartalmazó alkil-, aril-, alkoxi-aril- vagy alkarilcsoport. Azok a kaprolaktámaktivátorok, amelyekben az R^6 rész legalább 6, előnyösen 6–12 szénatomot tartalmaz, hidrofób fehérítést szolgáltatnak, amely nukleofil és testi szennyeződés eltávolítását nyújtja, ahogyan azt fent említettük. Azok a kaprolaktámaktivátorok, amelyekben R^6 1–6 szénatomot tartalmaz, olyan hidrofil fehérítőfajtákat eredményeznek, amelyek különösen hatékonyak italfoltok fehérítésére. Hidrofób és hidrofil kaprolaktámok keverékeit – jellemzően 1:5 és 5:1 tömegarány közöttieket, előnyösen 1:1 tömegarányúakat – felhasználhatjuk kevert foltok eltávolítására.

Felettébb előnyben részesített N-acil-kaprolaktámokat a benzoil-kaprolaktámot, oktanoil-kaprolaktámot, nonanoil-kaprolaktámot, 3,5,5-trimetil-hexanoil-kaprolaktámot, dekanoil-kaprolaktámot, undekanoil-kaprolaktámot és ezek keverékeit tartalmazó csoportból választjuk ki. N-acil-kaprolaktámok előállítására szolgáló módszerek jól ismertek a szakmában.

A 4,545,784 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban foglaltakkal ellentétben a fehérítőaktivátor előnyösen nem abszorbeálódik a peroxid fehérítővegyülethez. Más szerves detergens alkotórészek jelenlétében ez biztonsági problémákat okozhat.

Az (i)–(iii) típusú fehérítőaktivátorok legalább 0,1%, előnyösen 0,1–50%, még előnyösebben 1–30%, legelőnyösebben 3–25% tömegszázalék fehérítőrendszert vagy detergens készítményt tartalmaznak.

Az itt előnyben részesített amidoszármazék és kaprolaktám fehérítőaktivátorok felhasználhatók gumi- és enzimbiztos hidrofil aktivátorokkal – úgymint TAED-del – kombinációban is, az amidoszármazék vagy kaprolaktámaktivátor:TAED jellemzően 1:5 és 5:1 közötti, előnyösen 1:1 tömegarányában.

A fehérítőmechanizmus általában, és különösen a felületfehérítő mechanizmus nem teljesen ismert. Általában azonban azt feltételezzük, hogy a fehérítőaktivátort nukleofil támadás éri perhidroxidanion által, amely a peroxid fehérítő által fejlesztett hidrogén-peroxidból keletkezik peroxi-karbonsavat képezve. Ezt a reakciót gyakran perhidrolízisnek nevezik.

Ha az aktivátorokat használjuk, optimális felületfehérítő teljesítményt érünk el olyan mosóoldatokkal, amelyekben az ilyen oldat pH-ja 8,5–10,5 között és előnyösen 9,5–10,5 között van a perhidrolízisreakció elősegítése érdekében. Ilyen pH-értéket kaphatunk olyan vegyületekkel, amelyek általában pufferként ismeretesek, amelyek az itt leírt fehérítőrendszerek szabadon választható összetevői.

A peroxid fehérítővegyület

Az itt használható peroxid fehérítőrendszerek azok, amelyek vizes oldatban hidrogén-peroxid fejlesztésére képesek. Ezek a vegyületek jól ismertek a szakmában, és magukban foglalják a hidrogén-peroxidot és az alkálifém-peroxidokat, szerves peroxid fehérítővegyületeket, úgymint karbamid-peroxidot, és szervetlen persó fehérítővegyületeket, úgymint az alkálifém-perborátokat, -perkarbonátokat, -perfoszfátokat és hasonlókat. Két vagy több ilyen fehérítővegyület keveréke szintén alkalmazható, ha szükséges.

Előnyben részesített peroxid fehérítővegyületek közé tartozik a nátrium-perborát, amely a kereskedelemben mono-, tri- és tetrahidrát formában kapható, nátrium-pirofoszfát-peroxi-hidrát, karbamid-peroxi-hidrát, nátrium-perkarbonát és nátrium-peroxid. Különösen előnyben részesítjük a nátrium-perborát-tetrahidrátot, nátrium-perborát-monohidrátot és nátrium-perkarbonátot. A perkarbonátot különösen előnyben részesítjük, mivel tárolás során nagyon stabil és mégis nagyon gyorsan feloldódik a fehérítőfolyadékban. Feltételezzük, hogy ilyen gyors oldódás a perkarbonsav magasabb szintjeit és ezáltal fokozott felületfehérítő teljesítményt eredményez.

A felettébb előnyben részesített perkarbonát lehet fedetlen vagy fedett formában. A fedetlen perkarbonát átlagos részecskemérete 400–1200 μm közötti tartományban, előnyösebben 400–600 μm között van. Ha fedett perkarbonátot alkalmazunk, az előnyben részesített bevonóanyagok karbonát és szulfát, szilikát, bórszilikát vagy zsírsavak keverékeit foglalják magukban.

A peroxid fehérítővegyület legalább 0,1%, előnyösen 1–75%, még előnyösebben 3–40%, legelőnyösebben 3–25% tömegszázalék fehérítőrendszert vagy detergens készítményt tartalmaz.

A fehérítőrendszerben a fehérítőaktivátornak a peroxid fehérítővegyülethez viszonyított tömegaránya jellemzően 2:1 és 1:5 közötti. Előnyben részesített tartomány 1:1 és 1:3 közötti.

A peroxid fehérítővegyület által fejlesztett hidrogén-peroxidnak a fehérítőaktivátorhoz viszonyított moláris aránya nagyobb, mint körülbelül 1,0, még előnyösebben nagyobb, mint körülbelül 1,5, és legelőnyösebben 2,0–10 között van. Az itt leírt fehérítőkészítmények a peroxid fehérítővegyületnek előnyösen 0,5–20, legelőnyösebben 1–10 tömegszázalékát teszik ki.

Az itt leírt fehérítőaktivátor/fehérítővegyület rendszerek alkalmasak *per se* fehérítőként. Az ilyen fehérítőrendszerek azonban különösen olyan készítményekben használhatók, amelyek különböző detergens kiegészítőket – úgymint felületaktív anyagokat – mosószerépítőket és hasonlókat tartalmazhatnak.

2. Proteázenzimek

A találmány tárgyát olyan a természetben fel nem lelhető karbonil-hidroláz proteázenzim-változatok képezik, amelyek különböző proteolitikus aktivitással, stabilitással, szubsztrátspecifitással, pH-profillal és/vagy teljesítményjellemzőkkel rendelkeznek ahhoz a prekurzor karbonil-hidrolázhoz képest, amelyből a változat aminosavszekvenciája származik. A prekurzor karbonil-hidroláz lehet természetben előforduló karbonil-hidroláz vagy rekombináns hidroláz. Különösen olyan karbonil-hidroláz-változatok rendelkeznek a természetben fel nem lelhető aminosavszekvenciával, amelyek a prekurzor karbonil-hidroláz aminosavmaradékai többségének eltérő aminosavakkal való helyettesítésével származnak. A prekurzor enzim helyettesített aminosavma-

radékai megfelelnek a +76. helyzetű aminosavnak a következő egy vagy több maradékkal kombinálva: +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 és/vagy +274, ahol a számozott helyek megfelelnek a természetben előforduló, *Bacillus amyloliquefaciens*ből származó szubtilizinnek vagy más karbonil-hidrolázok vagy szubtilizinek, úgymint *Bacillus lentus* szubtilizin.

A karbonil-hidroláz-változatok, amelyek a találmány szerinti készítményekben használható proteázenzimek, egy vagy több módosítással kombinálva tartalmazzák a +76. helyzetű aminosavmaradék helyettesítését. A találmány számára hasznos proteázenzim-változatok előnyösen magukban foglalják aminosavmaradékok helyettesítését (szubsztitúcióját) a következő kombinációkban: 76/99; 76/101; 76/103; 76/104; 76/107; 76/123; 76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265 és/vagy 76/103/104/222. A találmány számára hasznos különböző enzimek legelőnyösebben a maradékok következő kombinációjában tartalmazzák aminosavmaradék helyettesítését: *B. amyloliquefaciens* szubtilizin 76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 és 76/101/104.

Ilyen karbonil-hidrolázokat vagy szubtilizinváltozatokat kódoló különböző DNS-szekvenciák olyan prekurzor DNS-szekvenciából származnak, amely a természetben előforduló vagy rekombináns prekurzor enzimet kódol. A különböző DNS-szekvenciák a prekurzor DNS-szekvencia olyan módosításával származnak, amely a prekurzor DNS-szekvencia által kódolt egy vagy több specifikus aminosavmaradék helyettesítését kódolja a következő helyzeteknek megfelelően: 76, 99, 101, 103, 104, 107, 123, 27, 105, 109, 126, 128, 135, 156, 166, 195, 197, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 és/vagy 274 *Bacillus amyloliquefaciens*ben vagy ezek bármilyen kombinációja. Jóllehet a módosításhoz azonosított aminosavmaradékok itt a *B. amyloliquefaciens*re alkalmazható számozás szerint vannak azonosítva (amely a maradékok helyzetének azonosítására szolgáló hagyományos módszerré vált minden szubtilizinben), a találmány számára használható, előnyben részesített prekurzor DNS-szekvencia a *Bacillus lentus* DNS-szekvenciája, ahogyan azt a 6. ábrán bemutatjuk (11. számú szekvenciavázlat).

Ezek a különböző DNS-szekvenciák a 76. aminosavmaradék behelyettesítését kódolják egy vagy több további módosítással kombinálva. A különböző DNS-szekvenciák aminosavmaradékok behelyettesítését előnyösen a következő kombinációkban kódolják: 76/99; 76/101; 76/103; 76/104; 76/107; 76/123; 76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/ /103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265 és/vagy 76/103/ /104/222. A különböző DNS-szekvenciák legelőnyösebben a maradékok következő kombinációinak módosítását kódolják: 76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/ /104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 és 76/101/104. Ezek a rekombináns DNS-szekvenciák olyan karbonil-hidroláz-változatokat kódolnak, amelyek új aminosavszekvenciával, és általában legalább egy olyan sajátsággal rendelkeznek, amely lényegesen különbözik a prekurzor karbonil-hidroláz DNS-szekvencia által kódolt azonos tulajdonságtól. Az ilyen sajátságok közé tartozik a proteolitikus aktivitás, szubsztrátspecifitás, stabilitás, megváltozott pH-profil és/vagy fokozott teljesítményjellemzők.

Az itt felhasználható proteázenzimek felölelik a 19 természetben előforduló L-aminosav bármelyikének behelyettesítését a megjelölt aminosavmaradék-helyzetekbe. Ilyen helyettesítéseket bármelyik prekurzor szubtilizinben (prokarióta, eukarióta, emlős stb.) végezhetünk. E bejelentés egésze során a különböző aminosavakra a szokásos egy- és hárombetűs kódokkal hivatkozunk. Ilyen kódokat azonosít könyvében Dale, J. W. [Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd. App. B (1989)].

Az elvégzendő helyettesítés az azonosított aminosavmaradék-helyek mindegyikénél előnyösen magában foglalja, de nem korlátozódik a: helyettesítésekre a 76. helyzetben, beleértve D, H, E, G, F, K, P és N; helyettesítésekre a 99. helyzetben, beleértve D, T, N, Q, G és S; helyettesítésekre a 101. helyzetben, beleértve G, D, K, L, A, E, S és R; helyettesítésekre a 103. helyzetben, beleértve Q, T, D, E, Y, K, G, R, S és A; helyettesítésekre a 104. helyzetben, beleértve mind a 19 természetben előforduló aminosavat; helyettesítésekre a 107. helyzetben, beleértve V, L, M, Y, G, E, F, T, S, A, N és I; helyettesítésekre a 123. helyzetben, beleértve N, T, I, G, A, C és S; helyettesítésekre a 27. helyzetben, beleértve K, N, C, V és T; helyettesítésekre a 105. helyzetben, beleértve A, D, G, R és N; helyettesítésekre a 107. helyzetben, beleértve A, L, V, Y, G, F, T, S és A; helyettesítésekre a 109. helyzetben, beleértve S, K, R, A, N és D; helyettesítésekre a 126. helyzetben, beleértve A, F, I, V és G; helyettesítésekre a 128. helyzetben, beleértve G, L és A; helyettesítésekre a 135. helyzetben, beleértve A, F, I, S és V; helyettesítésekre a 156. helyzetben, beleértve D, E, A, G, Q és K; helyettesítésekre a 166. helyzetben, beleértve mind a 19 természetben előforduló aminosavat; helyettesítésekre a 195. helyzetben, beleértve E; helyettesítésekre a 197. helyzetben, beleértve E; helyettesítésekre a 204. helyzetben, beleértve A, G, C, S és D; helyettesítésekre a 206. helyzetben, beleértve

L, Y, N, D és E; helyettesítésekre a 210. helyzetben, beleértve L, I, S, C és F; helyettesítésekre a 216. helyzetben, beleértve V, E, T és K; helyettesítésekre a 217. helyzetben, beleértve mind a 19 természetben előforduló aminosavat; helyettesítésekre a 218. helyzetben, beleértve S, A, G, T és V; helyettesítésekre a 222. helyzetben, beleértve mind a 19 természetben előforduló aminosavat; helyettesítésekre a 260. helyzetben, beleértve P, N, G, A, S, C, K és D; helyettesítésekre a 265. helyzetben, beleértve N, G, A, S, C, K, Y és H; és helyettesítésekre a 274. helyzetben, beleértve A és S aminosavakat. Minden ilyen helyzetben a különösen előnyben részesített behelyettesítendő aminosava(ka)t jelezzük az 1. táblázatban. Bár az 1. táblázatban specifikus aminosavakat mutatunk, megjegyezzük, hogy bármelyik aminosav behelyettesíthető az azonosított maradékok helyébe.

1. táblázat

Aminosav-maradék	A helyettesítésre/beszúrásra előnyben részesített aminosav
+ 76.	D, H
+ 99.	D, T, N, G
+101.	R, G, D, K, L, A, E
+103.	A, Q, T, D, E, Y, K, G, R
+104.	I, Y, S, L, A, T, G, F, M, W, D, V, N
+107.	V, L, Y, G, F, T, S, A, N
+123.	S, T, I
+ 27.	K
+105.	A, D
+109.	S, K, R
+126.	A, I, V, F
+128.	G, L
+135.	I, A, S
+156.	E, D, Q
+166.	D, G, E, K, N, A, F, I, V, L
+195.	E
+197.	E
+204.	A, G, C
+206.	L
+210.	I, S, C
+216.	V
+217.	H, I, Y, C, A, G, F, S, N, E, K
+218.	S
+222.	A, Q, S, C, I, K
+260.	P, A, S, N, G
+265.	N, A, G, S
+274.	A, S

Ezek a proteázenzimek, amelyek *in vitro* mutációkat tartalmaznak a *B. lentus* szubtilizinben a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin +76. helyének megfelelő aminosavmaradéknál, a prekurzor szubtilizinekhez képest megváltozott stabilitású (például módosított autoproteolitikus stabilitású) szubtilizinváltozatokat eredményeznek (lásd a 4. és 6. táblázatokat).

A *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 és/vagy +274 helyzeteinek megfelelő maradékoknál egyenként, vagy egymással kombinálva és a +76 mutációkkal bármilyen kombinációban történő *in vitro* mutáció szintén olyan szubtilizinváltozatokat eredményez, amelyek megváltozott proteolitikus aktivitást, megváltozott hőstabilitást, megváltozott pH-profilt, megváltozott szubsztrátspecifitást és/vagy megváltozott teljesítménytulajdonságokat mutatnak.

A karbonil-hidrolázok olyan proteázenzimek, amelyek hidrolizálják az O=C–X kötéseket tartalmazó vegyületeket, ahol az X oxigén vagy nitrogén. Magukban foglalnak természetben előforduló és rekombináns karbonil-hidrolázokat. A természetben előforduló karbonil-hidrolázok főként olyan hidrolázokat ölelnek föl, mint például peptidhidrolázokat, úgymint szubtilizineket vagy metalloproteázokat. A peptidhidrolázok közé tartozik az α-amino-acil-peptidhidroláz, peptidil-aminosav-hidroláz, acil-amino-hidroláz, szerin-karboxi-peptidáz, metallokarboxi-peptidáz, tiolproteináz, karboxilproteináz és metalloproteináz. Szerin-, metallo-, tiol- és savproteázok ugyanúgy beletartoznak, mint az endo- és exoproteázok.

„Rekombináns karbonil-hidroláz" olyan karbonil-hidrolázra utal, amelyben a természetben előforduló karbonil-hidrolázt kódoló DNS-szekvenciát módosítottuk olyan mutáns DNS-szekvencia előállítása céljából, amely a karbonil-hidroláz aminosavszekvenciájában egy vagy több aminosav helyettesítését, beszúrását vagy kivágását kódolja. Megfelelő módosítási módszereket itt teszünk közzé és a 4,760,025 (RE 34,606 számon újra érvénybe helyezett), 5,204,015 és 5,185,258 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban, amelyeket beépítettünk ide referenciaként.

A szubtilizinek baktérium- vagy gomba-karbonil-hidrolázok, amelyek általában fehérjék vagy peptidek peptidkötéseit bontva hatnak. „Szubtilizin" ahogyan itt használjuk, természetben előforduló szubtilizint vagy rekombináns szubtilizint jelent. A természetben előforduló szubtilizinek sorozata különböző mikrobafajok által termelt és gyakran kiválasztott szubtilizinként ismert. E sorozatok tagjainak aminosavszekvenciái nem teljesen homológok. E sorozatok szubtilizinjei azonban ugyanazt vagy hasonló típusú proteolitikus aktivitást mutatnak. A szerinproteázok ezen osztálya egy katalitikus triádot definiáló közös aminosavszekvenciával rendelkezik, amely megkülönbözteti őket a kimotripszinnel rokon szerinproteázok osztályától. A szubtilizinek és kimotripszinnel rokon szerinproteázok egyaránt rendelkeznek aszparaginsavat, hisztidint és szerint tartalmazó katalitikus triáddal. A szubtilizinnel rokon proteázokban ezen aminosavak relatív sorrendje – az aminovégtől a karboxilvég felé olvasva – aszparaginsav–hisz-

tidin–szerin. A kimotripszinnel rokon proteázokban azonban a relatív sorrend hisztidin–aszparaginsav–szerin. Tehát az itt leírt szubtilizin olyan szerinproteázt jelent, amely a szubtilizinrokon proteázok katalitikus triádjával rendelkezik. A példák tartalmazzák, de nem korlátozódnak a 3. ábrán azonosított szubtilizinekre.

„Rekombináns szubtilizin" olyan szubtilizinre utal, amelyben a szubtilizint kódoló DNS-szekvenciát módosítottuk olyan variáns (vagy mutáns) DNS-szekvencia előállítása céljából, amely a természetben előforduló szubtilizin aminosavszekvenciájában egy vagy több aminosav helyettesítését, kivágását vagy beszúrását kódolja. Ilyen módosítások elvégzésére szolgáló megfelelő módszereket, és amelyeket kombinálhatunk az itt közöltekkel, a 4,760,025 (RE 34,606 számon újra érvénybe helyezett), 5,204,015 és 5,185,258 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások tartalmaznak.

„Nem humán karbonil-hidrolázokat" és azokat kódoló DNS-eket kaphatunk több prokarióta és eukarióta szervezetből. A megfelelő példák prokarióta szervezetekre magukban foglalnak Gram-negatív szervezeteket, úgymint *E. coli*t vagy *Pseudomonas* speciest és Gram-pozitív baktériumokat, úgymint *Micrococcus* vagy *Bacillus* speciest. Példák eukarióta szervezetekre, amelyekből karbonil-hidrolázok és azok génjei kinyerhetők, felölelnek az élesztőt, úgymint *Saccharomyces cerevisiae*t, gombát, úgymint *Aspergillus* speciest és nem humán emlősforrásokat, úgymint például szarvasmarhafajt, amelyből a kimozin karbonil-hidrolázt kódoló gént nyerhetjük ki. Ahogyan a szubtilizineknél, karbonil-hidrolázok sorozatát kaphatjuk különböző olyan rokon fajokból, amelyek e sorozat tagjai között nem teljesen homológ aminosavszekvenciákkal rendelkeznek, mindamellett azonban ugyanazt vagy hasonló típusú biológiai aktivitást mutatnak. Tehát a nem humán karbonil-hidrolázok – ahogyan itt használjuk – funkcionális definíciójuk szerint olyan karbonil-hidrolázokat jelentenek, amelyek közvetlenül vagy közvetetten kapcsolatban vannak prokarióta- vagy eukariótaforrásokkal.

Egy „karbonil-hidroláz-változat" olyan aminosavszekvenciával rendelkezik, amely egy „prekurzor karbonil-hidroláz" aminosavszekvenciájából származik. A prekurzor karbonil-hidrolázok (úgymint szubtilizin) magukban foglalnak természetben előforduló karbonil-hidrolázokat (szubtilizin) és rekombináns karbonil-hidrolázokat (szubtilizin). A karbonil-hidroláz-változat aminosavszekvenciája a prekurzor hidroláz aminosavszekvenciájából „származik" a prekurzor aminosavszekvencia egy vagy több aminosavjának helyettesítésével, kivágásával vagy beszúrásával. Ilyen módosítás a prekurzor karbonil-hidroláz (szubtilizin) aminosavszekvenciáját kódoló „prekurzor DNS-szekvenciá"-ban inkább célszerű, mint magának a prekurzor karbonil-hidroláz-enzimnek (szubtilizin) a manipulációja. A prekurzor DNS-szekvencia ilyen manipulációjára megfelelő módszerek felölelik az itt közzétett módszereket ugyanúgy, mint a szakmában ismeretes módszereket (lásd például az EP 0 328299 számú európai szabadalmi leírást, WO 89/06279 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentést és a korábban már hivatkozott amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat és bejelentéseket).

A +76. helyzetnek megfelelő specifikus aminosavmaradékot egy vagy több helyzettel kombinálva a következők közül: +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 és/vagy +274 azonosítottuk *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizinben mutáció céljára. A módosított maradékokat előnyösen a következő kombinációk közül választottuk ki: 76/99; 76/101; 76/103; 76/104; 76/107; 76/123; 76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123; 76/103/ /104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/ /104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/ /104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/ /104/126/265 és/vagy 76/103/104/222; és a legelőnyösebbek: 76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 és 76/101/104. Ezek az aminosavhelyzet-számok az 1. ábrán bemutatott, érett *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin szekvenciájának jelöléseire vonatkoznak. A találmány számára hasznos proteázenzimek azonban nem korlátozódnak ennek az egy szubtilizinnek a mutációjára, hanem kiterjednek olyan prekurzor karbonil-hidrolázokra, amelyek a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizinben azonosított maradékokkal „ekvivalens" helyzetű aminosavmaradékokat tartalmaznak. Előnyösen a *Bacillus lentus* szubtilizinje a prekurzor szubtilizin, és a helyettesítéseket, kivágásokat vagy beszúrásokat azoknál az ekvivalens aminosavmaradékoknál végezzük a *Bacillus lentus*ban, amelyek megfelelnek a fent felsoroltaknak.

A prekurzor karbonil-hidroláz aminosavmaradéka akkor ekvivalens a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizinmaradékával, ha vagy homológ (azaz pozíciójában megfelel akár az elsődleges, akár a harmadlagos szerkezetnek), vagy analóg a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin specifikus maradékával vagy ennek a maradéknak egy részével (azaz kémiai egyesülésre, reakcióra vagy kölcsönhatásra ugyanazzal vagy hasonló funkciós képességgel rendelkezik).

Az elsődleges szerkezet homológiájának megállapítása céljából közvetlenül összehasonlítjuk a prekurzor karbonil-hidroláz aminosavszekvenciáját a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin elsődleges szekvenciájával és különösen a szubtilizinekben állandónak ismert maradékok csoportjával, amelyeknek a szekvenciája ismert. A 2. ábra mutatja a *Bacillus amyloliquefaciens* és a *Bacillus lentus* szubtilizin közötti konzervatív maradékokat. A konzervatív maradékok sorba állítása után, megengedve szükséges beszúrásokat és kivágásokat a sorrend fenntartása érdekében (azaz elkerülve a konzervatív maradékoknak korlátlan kivágások és beszúrások általi eltüntetését), definiáljuk a *Bacillus amyloliquefa-*

ciens szubtilizin elsődleges szerkezetének egyes aminosavjaival ekvivalens maradékokat. A konzervatív maradékok sorrendjének előnyösen az ilyen maradékok 100%-át kellene megőrizniük. Azonban a konzervatív maradékok 75%-nál nagyobb vagy olyan kicsi, mint 50%-os sorrendje szintén megfelelő ekvivalens maradékok definiálására. Az Asp32/His64/Ser221 katalitikus triád megőrzését fenn kell tartani.

Például a 3. ábrán a *Bacillus amyloliquefaciens*ből, *Bacillus subtilis*ből, *Bacillus licheniformis*ból (carlsbergensis) és *Bacillus lentus*ból származó szubtilizin aminosavszekvenciáját állítottuk sorba, hogy megállapítsuk a maximális homológiát az aminosavszekvenciák között. Ezeknek a szekvenciáknak az összehasonlítása azt mutatja, hogy számos konzervatív maradék van, amelyet minden szekvencia tartalmaz. Ezeket a konzervatív maradékokat (mint a BPN' és *B. lentus* között) azonosítjuk a 2. ábrán.

Ezek a konzervatív maradékok tehát felhasználhatók a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin megfelelő ekvivalens aminosavmaradékainak definiálására más karbonil-hidrolázokban, úgymint *Bacillus lentus* szubtilizinben (PCT WO 89/06279 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentés, közzététel 1989. július 13-án), az itt előnyben részesített szubtilizin prekurzor enzimben, vagy a PB92-ként (EP 0328299 számú európai szabadalmi leírás) említett szubtilizinben, amely nagymértékben homológ az előnyben részesített *Bacillus lentus* szubtilizinnel. Ezek közül bizonyos szubtilizinek aminosavszekvenciáit a 3A. és 3B. ábrákon sorba állítottuk a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin szekvenciájával a konzervatív maradékok maximális homológiájának megállapítására. Ahogyan látható, a *Bacillus lentus* szekvenciájában számos kivágás van a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizinnel összehasonlítva. Így például a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizinben Val165-tel ekvivalens aminosav a többi, *B. lentus* és *B. licheniformis* szubtilizinben izoleucin.

Így például a +76. helyzetű aminosav aszparagin (N) mind a *B. amyloliquefaciens*, mind a *B. lentus* szubtilizinben. A találmány számára hasznos, előnyben részesített szubtilizinváltozatban azonban a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin +76. helyzetével ekvivalens aminosavat aszparaginsavval (D) helyettesítettük. A 2. táblázatban szemléltetés céljából közreadjuk minden, helyettesítés céljából itt azonosított aminosavmaradék összevetését minden ilyen helyzetnél az előnyben részesített helyettesítésekkel.

2. táblázat

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
B. amyloliquefaciens (vad típus)	N	D	S	Q	Y	I	N
B. lentus (vad típus)	N	S	S	S	V	I	N
A legelőnyösebb helyettesítés	D	D	R	A	I/Y	V	S

Ekvivalens maradékok definiálhatók a prekurzor karbonil-hidroláz harmadlagos szerkezetének szintjében levő homológia meghatározásával is, amelynek harmadlagos szerkezetét röntgensugárzásos krisztallográfiával tárták fel. Ekvivalens maradékoknak tekintjük azokat, amelyeknél a sorba állítás után a prekurzor karbonil-hidroláz és a *B. amyloliquefaciens* szubtilizin kérdéses aminosavmaradéka főláncának atomjaiból kettőnek vagy többnek az atomkoordinátái (N az N-en, CA a CA-n, C a C-én, O az O-n) 0,13 nm-en belül, előnyösen 0,1 nm-en belül vannak. A sorba állítást elérjük, miután a legjobb modellt úgy irányítjuk és helyezzük el, hogy a kérdéses karbonil-hidroláz nem hidrogén fehérjeatomjainak koordinátái maximális fedésben legyenek a *B. amyloliquefaciens* szubtilizinnel. A legjobb modell az a krisztallográfiás modell, amely az elérhető legmagasabb felbontásnál a kísérleti diffrakciós adatokból a legalacsonyabb R-faktort adja.

$$\text{R-}faktor = \frac{\Sigma_h[Fo(\text{h})] - [Fc(\text{h})]}{\Sigma_h[Fo(\text{h})]}$$

A *B. amyloliquefaciens* szubtilizin specifikus maradékával funkcionálisan analóg ekvivalens maradékok definíció szerint a prekurzor karbonil-hidroláz azon aminosavai, amelyek úgy vehetnek fel konformációt, hogy vagy változnak, módosulnak vagy hozzájárulnak a fehérjeszerkezethez, szubsztrátkötéshez vagy katalízishez a *B. amyloliquefaciens* szubtilizin specifikus maradékánál definiált és annak tulajdonított módon. Továbbá ezek a prekurzor karbonil-hidroláznak azon maradékai (amelyeknek a harmadlagos szerkezetét röntgenkrisztallográfiával kaptuk), amelyek oly mértékben foglalnak el egy analóg helyzetet, hogy bár az adott maradék főláncának atomjai nem elégíthetik ki az ekvivalencia kritériumait a homológ helyzet elfoglalása alapján, a maradék oldalláncatomjaiból legalább kettőnek az atomkoordinátái 0,13 nm-en belül fekszenek a *B. amyloliquefaciens* szubtilizin megfelelő oldalláncának atomjaival. A *B. amyloliquefaciens* szubtilizin háromdimenziós szerkezetének koordinátáit az EPO 0251446 számú szabadalmi iratban tesszük közzé (megfelel a 08/212,291 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésnek, amelyet itt referenciaként beépítettünk) és ez felhasználható, ahogyan azt fent vázoltuk, ekvivalens maradékok meghatározására a harmadlagos szerkezet szintjén.

A helyettesítéshez, beszúráshoz vagy kivágáshoz azonosított maradékok némelyike konzervatív maradék, míg a többi nem. A nem konzervatív maradékok esetében egy vagy több aminosav cseréje olyan helyettesítésekre korlátozódik, amelyek a természetben fel nem lelhető aminosavszekvenciájú változatot eredményeznek. A konzervatív maradékok esetében az ilyen cseréknek nem kellene természetben előforduló szekvenciát ered-

ményezniük. A találmány számára hasznos karbonil-hidroláz-változatok felölelik a karbonil-hidroláz-változatok érett formáit ugyanúgy, mint az ilyen hidrolázváltozatok elő- és elő-előformáit. A elő-előformák az előnyben részesített szerkezetek, mivel ezek megkönnyítik a karbonil-hidroláz-változatok kifejezését, kiválasztódását és érését.

Az „előszekvencia" olyan aminosavak szekvenciájára utal a karbonil-hidroláz érett formájának N-terminális részéhez kapcsolva, amelynek az eltávolítása a karbonil-hidroláz „érett" formájának megjelenését eredményezi. Sok proteolitikus enzim található a természetben, mint transzlációs előenzimtermék és poszttranszlációs lépés hiányában ebben a formában fejeződik ki. Előnyben részesített előszekvencia a karbonil-hidroláz-változatok, különösen szubtilizinváltozatok előállítására a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin feltételezett előszekvenciája, bár más szubtilizin előszekvenciák is használhatók. A példákban a *Bacillus lentus* (ATCC 21536) szubtilizin vélt előszekvenciáját használjuk.

A „szignálszekvencia" vagy „előszekvencia" egy karbonil-hidroláz N-terminális részéhez vagy egy elő-hidroláz N-terminális részéhez kapcsolt bármilyen aminosavszekvenciára vonatkozik, amely részt vehet a hidroláz érett vagy előformáinak kiválasztódásában. A szignálszekvenciának ez a funkcionális meghatározása, magában kívánja foglalni mindazokat a szubtilizingén vagy más kiválasztható karbonil-hidrolázok génjeinek N-terminális véget kódoló része által kódolt aminosavszekvenciákat, amelyek részt vesznek a szubtilizin- vagy más karbonil-hidroláz-változatok kiválasztásának megvalósításában természetes körülmények között. A találmány számára hasznos proteázenzimek felhasználják az ilyen szekvenciákat a karbonil-hidroláz-változatok kiválasztásának végrehajtására, ahogyan azt itt leírtuk. A példákban használt előnyben részesített szignálszekvencia a *Bacillus subtilis* szubtilizinből származó szignálszekvencia első hét aminosavmaradékát a *Bacillus lentus*ból (ATCC 21536) származó szubtilizin szignálszekvenciájának fennmaradó részével egyesítve tartalmazza.

A karbonil-hidroláz-változat elő-előformája az érett hidroláz formából, melynek aminovégéhez működőképesen előszekvencia kapcsolódik, és az előszekvencia aminovégéhez működőképesen hozzákapcsolt „elő"- vagy „szignál"-szekvenciából áll.

Az „expressziós vektor" olyan DNS-szekvenciát tartalmazó DNS-szerkezetre utal, amely működőképesen kapcsolódik egy megfelelő, a nevezett DNS kifejeződését alkalmas gazdaszervezetben végrehajtani képes kontrollszekvenciához. Ilyen kontrollszekvenciák közé tartozik a transzkripció végrehajtására a promoter, az ilyen transzkripció ellenőrzésére egy adott operátorszekvencia, megfelelő mRNS riboszómakötő helyeket kódoló szekvencia és a transzkripció és a transzláció végét ellenőrző szekvenciák. A vektor lehet plazmid-, fágrészecske vagy egyszerűen egy potenciális genomiális inzert. Amint transzformáltuk egy alkalmas gazdaszervezetbe, a vektor replikálódhat és működhet a gazdaszervezet genomjától függetlenül, vagy néhány esetben integrálódhat magába a genomba. A jelen feltételek között a „plazmid" és „vektor" kifejezéseket időnként egymással felcserélhetően használjuk, mivel a vektor leggyakrabban alkalmazott formája jelenleg a plazmid. Azonban az expressziós vektoroknak olyan egyéb formái is idetartoznak, amelyek egyenértékű funkciókat szolgálnak, és amelyek ismertek vagy ismertté válnak a szakmában.

A találmányban használt „gazdasejtek" általában prokarióta vagy eukarióta gazdaszervezetek, amelyeket előnyösen átalakítottunk, a 4,760,025 számú (RE 34,606 számon újra érvénybe helyezett) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban közölt módszerek szerint enzimesen aktív endoproteázok kiválasztására képtelenné tettünk. Előnyben részesített gazdasejt szubtilizin kifejezésére a *Bacillus* BG2036 törzs, amely enzimesen aktív neutrális proteáz és alkalikus proteáz (szubtilizin) hiányos. A BG2036 törzs előállítását részleteiben az 5,264,366 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tartalmazza. Szubtilizin kifejezésére alkalmas egyéb gazdasejtek közé tartozik a *Bacillus subtilis* I168 (szintén a 4,760,025 (RE 34,606 számon újra érvénybe helyezett) és 5,264,366 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban, amelyeket itt referenciaként beépítettünk) ugyanúgy, mint bármilyen alkalmas *Bacillus* törzs, úgymint *B. licheniformis, B. lentus* stb.

A gazdasejteket transzformáljuk vagy megfertőzzük rekombináns DNS-technikák felhasználásával összeállított vektorokkal. Az ilyen transzformált gazdasejtek vagy a karbonil-hidroláz-változatokat kódoló vektorok replikációjára vagy a kívánt karbonil-hidroláz-változat kifejezésére képesek. Olyan vektorok esetében, amelyek a karbonil-hidroláz-változat elő- vagy elő-előformáját kódolják, az ilyen változatok amikor kifejeződnek, tipikusan a gazdasejt táptalajába választódnak ki a gazdasejtből.

„Működőképesen hozzákapcsolva", amikor leírjuk a két DNS-régió közötti kapcsolatot, egyszerűen azt jelenti, hogy azok funkcionálisan kapcsolatban állnak egymással. Például egy előszekvencia működőképesen kapcsolódik egy peptidhez, ha szignálszekvenciaként működik, részt vesz a fehérje érett formájának kiválasztódásában legvalószínűbb, hogy magában foglalja a szignálszekvencia lehasítását. Egy promoter működőképesen kapcsolódik egy kódolószekvenciához, ha kontrollt gyakorol a szekvencia transzkripciójára; egy riboszómakötő hely működőképesen kapcsolódik egy kódolószekvenciához, ha úgy helyezkedik el, hogy lehetővé teszi a transzlációt.

A természetben előforduló prekurzor karbonil-hidrolázt kódoló géneket megkaphatjuk a szakmában ismert általános módszerek szerint. A módszerek általában magukban foglalják olyan jelzett próbák szintézisét, amelyek vélhetően a kérdéses hidroláz régióit kódoló szekvenciákkal rendelkeznek, genomiális könyvtár elkészítését a hidrolázt kifejező szervezetekből, és a könyvtárak screenelését a kérdéses génre a próbákkal történő hibridizációval. A pozitívan hibridizáló klónokat azután térképezzük és szekvenáljuk. A példákban

felhasznált *B. lentus* gént az 5,185,258 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás – amelynek közzétételét itt beépítettük – 1. példájában leírtak szerint klónozzuk. A példákban felhasznált BPN' gént a 4,760,025 számú (RE 34,606 számon újra érvénybe helyezett) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás – amelynek közzétételét itt beépítettük – 1. példájában leírtak szerint klónozzuk.

A klónozott karbonil-hidrolázt azután felhasználjuk egy gazdasejt transzformálására a hidroláz kifejezése céljából. A hidrolázgént ezután ligáljuk egy nagy példányszámú plazmidba. Ez a plazmid replikálódik a gazdaszervezetben olyan értelemben, hogy az tartalmazza a plazmidreplikációhoz szükséges jól ismert elemeket: promotert működőképesen hozzákapcsolva a kérdéses génhez (amelyet betölthet a gén saját homológ promotere, ha azt a gazdaszervezet felismeri, azaz átírja), transzkripciós terminációs és poliadenilációs régiót (bizonyos eukarióta gazdasejtekben a gazdaszervezet által a hidrolázgénből átírt mRNS stabilitásához szükséges), amely exogén vagy betöltheti a hidrolázgén endogén terminátorrégiója, és kívánság szerint egy szelekciós gén, úgymint antibiotikumrezisztencia gén, amely képessé teszi a plazmiddal fertőzött gazdasejteket folyamatos fenntartó tenyésztésre antibiotikumot tartalmazó táptalajokon. Nagy példányszámú plazmidok tartalmaznak egy replikációs forrást a gazdaszervezet mellett is, lehetővé téve ezáltal plazmidok nagy számban történő keletkezését a citoplazmában kromoszomális korlátozás nélkül. A hidrolázgén többszörös példányainak gazdaszervezet genomjába történő beépítése azonban az oltalmi körbe tartozik. Ezt elősegítik prokarióta és eukarióta szervezetek, amelyek különösen fogékonyak homológ rekombinációra.

Az itteni példákban használt gének, egy természetes *B. lentus* gén és egy természetes *B. amyloliquefaciens* gén. Egy másik lehetőség szerint előállíthatunk természetben előforduló vagy mutáns prekurzor karbonil-hidrolázt (szubtilizint) kódoló szintetikus gént: Egy ilyen megközelítésben a prekurzor hidroláz (szubtilizin) DNS- és/vagy aminosavszekvenciáját határozzuk meg. Azután többszörös, egymást átfedő szintetikus egyszálú DNS-fragmentumokat szintetizálunk, amelyek hibridizációval és ligációval a prekurzor hidrolázt kódoló szintetikus DNS-t eredményeznek. Szintetikus gén összeállítására tesz közzé példát az 5,204,015 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás – amelynek közzétételét itt beépítettük referenciaként – 3. példája.

Amint megtörtént a természetben előforduló vagy szintetikus prekurzor karbonil-hidroláz-gén klónozása, a természetben előforduló prekurzor karbonil-hidroláz szintézisén túlmenően számos módosítást végzünk a gén hasznosságának fokozására. Az ilyen módosítások magukban foglalják rekombináns karbonil-hidrolázok előállítását a 4,760,025 számú (RE 34,606 számon újra érvénybe helyezett) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és EPO 0251446 számú szabadalmi iratban közöltek szerint, és itt leírt karbonil-hidrolázváltozatok előállítását.

A következő kazettamutagenezis módszer alkalmazható a találmány számára hasznos karbonil-hidrolázváltozatok összeállításának és azonosításának megkönnyítésére, jóllehet más módszerek, beleértve a helyre irányított mutagenezist is alkalmazhatunk. Először a hidrolázt kódoló, természetben előforduló gént nyerjük ki és teljes egészében vagy részben szekvenáljuk. Azután a szekvenciát végigvizsgálva olyan pontot keresünk, amelynél kívánatos egy vagy több aminosav mutációja (kivágása, beszúrása vagy helyettesítése) a kódolt enzimben. Az ezt a pontot szegélyező szekvenciákat restrikciós helyek jelenlétére vizsgáljuk, hogy a génnek egy rövid szakaszát olyan oligonukleotid-poollal cseréljük ki, amelyek azután kifejeződve különböző mutánsokat kódolnak. Az ilyen restrikciós helyek előnyösen egyedülállóak a hidrolázgénen belül, hogy megkönnyítsék a génszegmens kicserélését. Azonban bármilyen alkalmas restrikciós hely felhasználható – amely nem fordul elő túlzott gyakorisággal a hidrolázgénben – restrikciós emésztéssel keletkezett génfragmentumok előállítására, amelyek újra összeállíthatók megfelelő szekvenciává. Ha a kiválasztott ponttól megfelelő távolságra (10–15 nukleotid) nincsenek restrikciós helyek, ilyen helyeket nukleotidoknak a génbe történő behelyettesítésével hozunk létre oly módon, hogy a végső összeállításnál sem a leolvasási keret, sem a kódolt aminosavak nem változnak meg. A gén mutációját abból a célból, hogy szekvenciáját hasonlóvá tegyük a kívánt szekvenciához, M13 primer kiterjesztéssel végezzük általánosan ismert módszerek szerint. Az elvégzendő feladat, alkalmas szegélyezőrégiók helyének felderítésére és két megfelelő restrikciós hely eléréséhez szükséges változtatások megállapítására, rutinszerűen történik a genetikai kód bőséges mennyiségével, a gén restrikciósenzim-térképével és a nagyszámú különböző restrikciós enzimmel. Megjegyezzük, hogy ha rendelkezésre áll megfelelő szegélyező restrikciós hely, a fenti módszert csak avval a szegélyezőrégióval kapcsolatban kell alkalmazni, amely nem tartalmaz ilyen helyet.

Amint a természetben előforduló DNS-t vagy szintetikus DNS-klónoztuk, a mutációra kiszemelt helyzeteket szegélyező restrikciós helyeket emésztjük a rokon restrikciós enzimekkel és a végcsoportokkal komplementer oligonukleotid-kazetták többségét ligáljuk a génbe. A mutagenezis egyszerűsödik ezzel a módszerrel, mivel mindegyik oligonukleotid szintetizálható oly módon, hogy ugyanazokkal a restrikciós helyekkel rendelkezzen, és nem szükségesek szintetikus linkerek a restrikciós helyek létrehozásához.

Ahogyan itt használjuk, a proteolitikus aktivitást úgy definiáljuk, mint a peptidkötések hidrolízisének arányát milligramm aktív enzimre vonatkoztatva. Sok jól ismert eljárás létezik a proteolitikus aktivitás mérésére [Kalisz K. M., Microbial Proteinases, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter ed. (1988)]. A módosított proteolitikus aktivitáson túl vagy más lehetőségként, a találmány különböző enzimjei rendelkezhetnek más módosított sajátságokkal, úgymint K_m, K_{cat}, K_{cat}/K_m arány és/vagy módosított szubsztrátspecifitás és/vagy módosított pH-aktivitás-profil. Ezek az enzimek

alakíthatók az egyes szubsztrátokhoz, amelyek előre láthatóan jelen lesznek, például hidrolitikus folyamatokban, úgymint mosodai használatnál.

Célirányosan biztosítható egy megváltozott proteolitikus aktivitású karbonil-hidroláz-változat a prekurzor karbonil-hidrolázzal összehasonlítva, mióta az ilyen aktivitás megnövelése (nagyságrenddel nagyobbra) lehetővé teszi az enzim célszubsztráton való sokkal hatásosabb működésének felhasználását. Szintén fontosak különböző, a prekurzorhoz képest megváltozott hőstabilitással és/vagy megváltozott szubsztrátspecifitással bíró enzimek. A mutációnak alávetendő karbonil-hidroláz előnyösen szubtilizin. Specifikus aminosavakat mutatunk be a példákban – amelyek felhasználhatók arra, hogy szubtilizin típusú karbonil-hidrolázokban ilyen eredményeket kapjunk – a következő helyekkel ekvivalens maradékoknál: +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 és/vagy +274 vagy ezek bármilyen kombinációjában *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizinben. Néhány esetben kívánatos lehet gyengébb proteolitikus aktivitás. Néhány esetben viszont fordítva, kívánatos lehet a különböző enzimek proteolitikus aktivitásának növelése a prekurzorral szemben. Továbbá kívánatos lehet a változat stabilitásának – vagy alkalikus vagy hőstabilitásának – növelése vagy csökkentése (megváltoztatása). Növekedés vagy csökkenés a K_{cat}-, K_m-, K_{cat}/K_m értékekben ezeknek a kinetikai paramétereknek a meghatározásához használt szubsztrátra specifikus.

Szintén meghatároztuk, hogy a +76. helyzettel ekvivalens maradékok – kombinációban számos más módosítással – a szubtilizinben fontosak az enzim stabilitásának és/vagy proteolitikus aktivitásának átfogó szabályozásában. Így tehát, ahogyan azt a példákban közzétesszük, az előnyben részesített proteázenzimekben az aszparagin (N) a *Bacillus lentus* szubtilizinben a +76. helyzettel ekvivalens pozícióban helyettesíthető aszparaginsavval (D) kombinációban egy vagy több következő aminosavmaradék módosításával: +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 és/vagy +274 az eredményül kapott mutáns enzim fokozott stabilitásának és/vagy fokozott aktivitásának létrehozására.

A találmányban felhasználható leginkább előnyben részesített proteázenzimeket a példákban mutatjuk be. Ezek felölelik a helyettesített maradékok következő specifikus kombinációit: N76D/S99D; N76D/V104I; N76D/S99D/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V és N76D/S101R/S103A/V104I. Ezeket a helyettesítéseket előnyösen a *B. lentus* (rekombináns vagy természetes típusú) szubtilizinben végezzük, bár a helyettesítések elvégezhetők bármilyen *Bacillus* szubtilizinben.

Az ezzel és más különböző szubtilizinekkel kapott eredményekre alapozva nyilvánvaló, hogy a karbonil-hidrolázokban (előnyösen szubtilizinben) a következő *Bacillus amyloliquefaciens* helyzetekkel ekvivalens maradékok: +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 és/vagy +274 fontosak ezeknek az enzimeknek a proteolitikus aktivitására, teljesítményére és/vagy stabilitására és az ilyen enzimváltozatok tisztító- vagy mosási teljesítményére nézve.

A következőket a találmány készítményeiben használható proteázenzimek előállítására szolgáló példákon keresztül mutatjuk be.

Proteázgyártási példa

Összeállítás a GG36 gén kifejezésére B. subtilisben

A klónozást és a *B. lentus*ból származó szubtilizingénnek a kifejezéshez történő összeállítását lényegében ugyanúgy végezzük el, ahogy azt az 5,185,258 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírják. A GGA274 plazmidot (a 4. ábra mutatja be) továbbmódosítjuk a következő módon, ahogyan azt az 5. ábrán mutatjuk. A PstI helyet, amelyet az összeállításnál vittünk be a GGA274 plazmid szerkezetébe, eltávolítjuk – az alábbiakban leírt – oligonukleotid irányította mutagenezissel, a következő szekvenciával rendelkező oligonukleotiddal:

5' GAAGCTGCAACTCGTTAAA 3' (1. számú szekvenciavázlat).

Az aláhúzott „A" maradék megszünteti a PstI restrikciósenzim-felismerő szekvenciát, és a megfelelő aminosavmaradékot alaninról treoninra változtatja a 274. helyzetben. A 274. helyzetű treonin a vad típusú maradék, eredetileg a klónozott *B. lentus* szubtilizingénszekvenciákban fordul elő. A szubtilizint kódoló DNS-szegmenst kivágjuk a GGA274 plazmidból vagy annak származékaiból (GGT274, az 5. ábrán) EcoRI-gyel és BamHI-gyel történő emésztéssel. A DNS-fragmentumot visszaszubklónozzuk M13 bakteriofág-alapú vektorokba, úgymint MP19-be, mutagenezishez. Mutagenezis után az EcoRI és HindIII emésztést, amelyet klónozás követ, a mutációt szenvedett szubtilizingénnek egy GGA274-hez hasonló expressziós plazmidba történő visszavitele céljából végezzük a mutáns szubtilizinfehérjék kifejezésére és kinyerésére.

Oligonukleotid irányította mutagenezis

Oligonukleotid irányította mutagenezist végzünk Zoller és munkatársai leírása alapján [Zoller M. et al., Methods Enzymol. *100,* 468–500 (1983)]. Példaként az

5' GCTGCTCTAGACAATTCG 3' (2. számú szekvenciavázlat)

szintetikus oligonukleotidot használjuk a 76. helyzetű aminosavmaradék aszparaginról (N) aszparaginsavra (D) – N76D – történő kicseréléséhez. Az aláhúzott „G" és „C" maradékok jelzik a változásokat a vad típushoz képest. A CA megtartja az izoleucint a 75. helyzetben, és megváltoztatja az aminosavszekvenciát egy XbaI restrikciósenzim-felismerő hely (TCTAGA) bevitelével, miközben a változtatás a GAC-nál az aszparagint a 76. helyzetben aszparaginsavra változtatja.

A 99., 101., 103. és 104. helyzetekben különböző oligonukleotidokat használhatunk mutagenezishez a kívánt mutációk kombinációjától függően. Az

5' GTATTAGGGGCGGACGGTCGAGGCGC CATCAGCTCGATT 3' szekvenciájú

(3. számú szekvenciavázlat) nukleotidot használjuk például a következő egyidejű változtatások elvégzésére: S99D; S101R; S103A és V104I egy szubtilizinmolekulában. Ehhez hasonlóan, az
5' TCAGGTTCGGTCTCGAGCGTTGCCCAAGG ATTG 3' szekvenciájú
(4. számú szekvenciavázlat) és az 5' CACGTTGCTA GCTTGAGTTTAG 3' szekvenciájú
(5. számú szekvenciavázlat) oligonukleotidokat használjuk fel az I107V és N123S létrehozására külön-külön. Az aláhúzott maradékok jelzik megint a változtatásokat a vad típusú szekvenciákból, amelyek vagy az aminosavszekvenciákban vagy a restrikciósenzim-felismerő szekvenciákban bekövetkező kívánt változásokat eredményezik.

A szubtilizinváltozatok proteolitikus aktivitása

Az előbbi oligonukleotid irányította mutagenezist követően a 3. táblázatban felsorolt változatok készültek. Ezen szubtilizinváltozatok mindegyikének proteolitikus aktivitását mutatja a 3. táblázat. A K_{cat}, K_m, K_{cat}/K_m kinetikai paramétereket a szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitro-anilid szintetikus peptidszubsztrát hidrolízisére mértük meg, a Bonneau és munkatársai által leírt módszer [Bonneau P. et al., J. Am. Chem. Soc. *113* (3), 1030 (1991)] szerint. Röviden a szubtilizinváltozat törzsoldatának kis részletét a szubsztrátot 0,1 M Tris-HCl-pufferben (pH 8,6) feloldva tartalmazó 1 cm^3-es küvettába tesszük, és 25 °C-on termosztáljuk. A reakció előrehaladtát spektrofotometriásan követjük a p-nitro-anilin reakciótermék abszorbanciájának nyomon követésével 410 nm-en. Kinetikai paramétereket kapunk nemlineáris regressziós algoritmus alkalmazásával, minden egyes reakció sebességének és termékkoncentrációjának a Michaelis–Menten-egyenletbe illesztésével.

3. táblázat

A *Bacillus lentus* szubtilizinben és változataiban mért kinetikai paraméterek

	Proteázenzim-változatok	K_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	K_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
–	*B. lentus* szubtilizin	170	0,000 78	$2,18\times10^5$
–	N76D	219	0,000 8	$2,74\times10^5$
1.	N76D/S99D	88	0,000 61	$1,44\times10^5$
2.	N76D/S101R	371	0,001 3	$2,85\times10^5$
3.	N76D/S103A	400	0,001 4	$2,86\times10^5$
4.	N76D/V104I	459	0,001 1	$4,17\times10^5$
5.	N76D/I107V	219	0,001 1	$1,99\times10^5$
6.	N76D/N123S	115	0,001 8	$6,40\times10^4$
7.	N76D/S99D/S101R	146	0,000 38	$3,84\times10^5$
8.	N76D/S99D/S103A	157	0,001 2	$1,31\times10^5$
9.	N76D/S99D/V104I	247	0,000 97	$2,55\times10^5$
10.	N76D/S101R/S103A	405	0,000 69	$5,90\times10^5$
11.	N76D/S101R/V104I	540	0,000 49	$1,10\times10^6$
12.	N76D/S103A/V104I	832	0,001 6	$5,20\times10^5$
13.	N76D/V104I/I107V	497	0,000 45	$1,10\times10^6$
14.	N76D/V104Y/I107V	330	0,000 17	$1,90\times10^6$
15.	N76D/V104I/N123S	251	0,002 6	$9,65\times10^4$
16.	N76D/I107V/N123S	147	0,003 5	$4,20\times10^4$
17.	N76D/S99D/S101R/S103A	242	0,000 74	$3,27\times10^5$
18.	N76D/S99D/S101R/V104I	403	0,000 72	$5,60\times10^5$
19.	N76D/S99D/S103A/V104I	420	0,001 6	$2,62\times10^5$
20.	N76D/S101R/S103A/V104I	731	0,000 65	$1,12\times10^6$
21.	N76D/S103A/V104I/N123S	321	0,002 6	$1,23\times10^5$
22.	N76D/V104I/I107V/N123S	231	0,00 3	$7,70\times10^4$
23.	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0,00 098	$6,37\times10^5$
24.	N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0,004 3	$4,51\times10^4$
25.	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0,002 3	$1,35\times10^5$

A 3. táblázatban felsorolt eredmények azt jelzik, hogy minden vizsgált szubtilizinváltozat megőrzi proteolitikus aktivitását. Továbbá az adatok részletes analízise elénk tárja, hogy a proteolitikus aktivitás szignifikánsan változott a *Bacillus lentus* szubtilizinhez képest, a *Bacillus amyloliquefaciens*ben 76, 99, 101, 103, 104, 107 és 123 helyzetekkel ekvivalens aminosavmaradékoknál történt helyettesítések különböző kombinációival.

A szubtilizinváltozatok hőstabilitása

A *Bacillus lentus* szubtilizin és – az oligonukleotid irányította mutagenezis eljárásával az előbbiek szerint előállított – találmány szerinti változatok hőstabilitásának összevetésénél megfigyelteket a 4. táblázatban mutatjuk be. Tisztított enzimből 15 μg/ml 0,1 M glicin 0,01% Tween–80 pH 10,0 oldatban, 50 mM $CaCl_2$-dal vagy a nélkül kis részletekben kis csövekbe és inkubálva 10 °C-on 5 percig, 10 °C-ról 60 °C-ra 1 percen belül, és 60 °C-on 20 percig. A csöveket ezután 10 percre jégre tesszük. A csövek kis részleteiből enzimaktivitást határozunk meg 1,2 mM szukcinil–L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitro-anilid szintetikus peptidszubsztrátot 0,1 M Tris-HCl-pufferben (pH 8,6) feloldva tartalmazó 1 cm^3-es küvettákhoz adva, és 25 °C-on termosztálva. A kezdeti lineáris reakciósebességet spektrofotometriásan követjük a p-nitro-anilin reakciótermék abszorbanciájának nyomon követésével 410 nm-en az idő függvényében. A hőkezelést megelőzően kapott adatokat százalékos aktivitásként mutatjuk be. A 4. táblázatban felsorolt eredmények azt mutatják, hogy a változatok nagy többsége a *Bacillus lentus* szubtilizinnel összehasonlítható hőstabilitást mutat (26-ból 24) a vizsgálati körülmények között, 50 mM $CaCl_2$ hozzáadásával. 50 mM $CaCl_2$ hozzáadása nélküli vizsgálati körülmények között a változatok nagy többsége (26-ból 19) szignifikánsan stabilabb, mint a *Bacillus lentus* szubtilizin. Továbbá az N76D/S99D; N76D/V104I; N76D/S99D/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V és N76D/S101R/S103A/V104I változatok szignifikánsan stabilabbak, mint az egyszeresen helyettesített N76D változat, 50 mM $CaCl_2$ hozzáadása nélküli vizsgálati körülmények között.

4. táblázat

A *Bacillus lentus* szubtilizinben és változataiban mért kinetikai paraméterek (pH 10, 60 °C, +/–50 mM $CaCl_2$ hozzáadásával)

Enzim	Maradék %-os kezdeti aktivitás	
	$-CaCl_2$	$+CaCl_2$
B. lentus szubtilizin	2	96
N76D	34	97
N76D/S99D	49	98
N76D/S101R	0	82
N76D/S103A	26	92
N76D/V104I	58	98
N76D/I107V	32	96
N76D/N123S	0	97
N76D/S99D/S101R	30	100
N76D/S99D/S103A	36	100
N76D/S99D/V104I	48	97
N76D/S101R/S103A	26	100
N76D/S101R/V104I	38	100
N76D/S103A/V104I	58	100
N76D/V104I/I107V	60	97
N76D/V104Y/I107V	48	74
N76D/V104I/N123S	0	98
N76D/I107V/N123S	16	100
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100
N76D/S99D/S101R/V104I	33	100
N76D/S99D/S103A/V104I	38	98
N76D/S101R/S103A/V104I	40	99
N76D/S103A/V104I/N123S	1	98
N76D/V104I/I107V/N123S	3	99

4. táblázat (folytatás)

Enzim	Maradék %-os kezdeti aktivitás	
	$-CaCl_2$	$+CaCl_2$
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	100

Oligonukleotid irányította mutagenezis fágmidból létrehozott egyszálú DNS-templáttal

A) B. lentus változatok összeállítása

A mutagenezis menete lényegében ugyanaz, mint ahogyan fent leírtuk az Oligonukleotid irányította mutagenezis című fejezetben. Az egyszálú DNS-templátot fágmidmódszerrel hozzuk létre. A fágmidvektor összeállítására az egyszálú DNS-templát létrehozásához, mi először a pBCDAICAT vektort állítjuk össze. A vektor megszerkesztésének folyamatábráját a 8. ábrán mutatjuk be. Először a pC194 plazmidból származó, a CAT gént meghatározó ClaI-től ClaI-ig terjedő fragmentumot [Horinouchi S. és Weisblum B., J. Bacteriol. *150,* 8–15 (1982)] klónozzuk a pUC19 (New England BioLabs, Beverly, MA) polilinkerrégiójának AccI helyére a pUCCHL plazmid elkészítéséhez, és a GG36DAI kódoló-DNS 5'-végéből való EcoRI-DraI 0,6 kb fragmentumot klónozzuk a pBC2SK-plazmid (Stratagene, Inc., San Diego, CA) EcoRI és EcoRV helyeire a pBC2SK-5 plazmid elkészítéséhez. A pBC2SK-5 plazmid egyedüli EcoRI helyét EcoRI emésztéssel távolítjuk el, amelyet T4 DNS-polimerázzal katalizált feltöltés követ és religáció a pBC2SK-5R plazmid létrehozására, amely nem tartalmazza az EcoRI helyet. A pBC2SK-5R-be klónozott EcoRI-DraI fragmentumot PstI-HindIII fragmentumként izoláljuk és klónozzuk a pUCCHL (a pUC19 polilinkerének egy részébe) PstI-HindIII helyére, hogy létrehozzuk a pUCCHL5R plazmidot. A GG36DAI gén kódolószekvenciáját EcoRI-BamHI fragmentumként kivágjuk és klónozzuk a pUCCHL5R plazmid EcoRI-BamHI helyére a pUCCAT elkészítése céljából. A pUCCAT hatalmas EcoRI-HindIII fragmentumát ezután a pBS2KS+ EcoRI és HindIII helyei közé klónozzuk, hogy létrehozzuk a pBCDAICAT plazmidot.

Egyszálú DNS létrehozása céljából pBCDAICAT plazmidot tartalmazó *E. coli*t fertőzünk R408 fággal (Stratagene-től beszerezve) Russel és munkatársai leírása [Russel M., Kidd S. és Kelley M. R., Gene *45,* 333–338 (1986)] szerint. Amint az egyszálú DNS-templát rendelkezésre áll, standard mutagenezismódszereket hajtunk végre, ahogyan azt fent az Oligonukleotid irányította mutagenezis című fejezetben leírtuk. Bizonyos mutánsok szerkezetét részletezzük az alábbiakban szemléltetés céljából.

A *B. lentus* (GG36)N76D/S103A/V104I/L217H előállításához egy GG36 N76D/S103A/V104I összeállítást kódoló EcoRI-BamHI DNS-fragmentumot használunk fel a pUCCAT megszerkesztéséhez (lásd a 8. ábrát), hogy létrehozzuk a pBCDAICAT plazmidot. Miután az egyszálú DNS-templátot elkészítettük a fenti leírás szerint, a következő szekvenciával rendelkező mutagenezis primert használjuk az L217H előállításához:

* *** **x ClaI
5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3'

(13. számú szekvenciavázlat). Ahogy az előzőekben, az aláhúzott maradékok jelzik az elvégzett nukleotidváltoztatásokat és az x ClaI azt jelzi, hogy a meglévő ClaI hely eltűnt a mutagenezis után. A mutagenezis menete ugyanaz, ahogyan azt fent az *Oligonukleotid irányította mutagenezis* című fejezetben leírtuk. A mutagenezis után a plazmid-DNS-t először a ClaI hely eltűnésére screeneljük, és a ClaI helyet nem tartalmazó klónokat DNS-szekvenciaanalízisnek vetjük alá, hogy megvizsgáljuk, melyik DNS-szekvencia változtatta Hra az L-t a 217. aminosavmaradéknál.

B) *BPN'-változatok összeállítása és kifejezésük B. subtilisben*

A *B. amyloliquefaciens* (BPN')N76D/Q103A/V104I/Y217L összeállítását hasonló módon végezzük, két egymást követő lépés kivételével. Először N76D-t visszük be BPN'Y217L-be BPN'N76D/Y217L előállítására, és egy második mutagenezis során a BPN'N76D/Y217L-t alakítjuk át BPN'N76D/Q103A/Y104I/Y217L-lé. Az egyszálú DNS-templát létrehozására az első mutagenezishez, BPN'Y217L szubtilizint kódoló EcoRI-BamHI fragmentumot (az Y217L plazmidból származik) [Wells J. et al., PNAS *84,* 5167 (1987)] használunk fel a pUCCATFNA összeállítására (lásd a 9. ábrát). A BPN'Y217L-t tartalmazó pUCCATFNA plazmidot a pBCFNACAT plazmid (9. ábra) megszerkesztésére használjuk fel. Egyszálú DNS-t hozunk létre, ahogyan azt fent leírtuk. BPN'N76D/Y217L előállítására a következő szekvenciával rendelkező oligonukleotid primert használjuk az N76D változtatás elvégzéséhez:

* *** **XbaI
5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3'

(14. számú szekvenciavázlat). Az egyszálú DNS-t azután a BPN'N76D/ /Y217L-t tartalmazó pBCFNACAT plazmidból (a pBCFNACAT plazmid az N76D mutagenezis után) készítjük el és egy másik, a következő szekvenciával rendelkező oligonukleotiddal végzünk mutagenezist:

* *** **xPvuII

5' GCT GAC GGT TCC GGC GCT ATT AGT TGG ATC ATT 3'

(15. számú szekvenciavázlat), hogy BPN'N76D/ /Q103A/Y104I/Y217L-t kapjunk. A klónozásba beletartozó minden lépést, az egyszálú DNS elkészítését, a mutagenezist és a mutánsok screenelését a fentiekben leírtak szerint végezzük. A BPN' génnek és változatainak kifejezését a plazmid DNS-nek (különböző BPN' génváltozatokat tartalmazó pBCFNACAT-nak) közvetlenül a *Bacillus subtilis* egy proteázhiányos törzsébe történő beépítésével érjük el, a 4,760,025 (RE 34,606) számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint.

Számos változatot készítünk a proteáz-előállítási példák tanítása szerint. Kinetikai és stabilitási adatokat határozunk meg az ilyen változatokra. A kinetikai adatokat az előbbiekben leírt módszerek felhasználásával határozzuk meg és az 5. táblázatban adjuk közre. A stabilitási adatokat a következőkben részletezettek szerint kapjuk. Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be.

Eljárás a hőstabilitás meghatározására

A tisztított enzimet puffercserére visszük 0,1 M glicint, pH 10,0 és 0,01% Tween–80-at tartalmazó pufferrel. Az enzimet a nevezett pufferrel ekvilibrált Sephadex G–25 oszlopra visszük fel, majd ugyanennek a puffernek az alkalmazásával eluáljuk az enzimet az oszlopról.

0,1 M glicint és 0,01% Tween–80-at (pH 10,0) tartalmazó, 60 °C-on termosztált csőbe visszük a puffercserélt enzimet oly módon, hogy 15 μg/ml végső enzimkoncentrációt kapjunk.

A 60 °C-os termosztálásból különböző időpontokban kis részleteket kiveszünk és azonnal meghatározzuk az enzimaktivitást, a mintát 1,2 mM szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitro-anilid szintetikus peptidszubsztrátot 0,1 M Tris-HCl-pufferben (pH 8,6) feloldva tartalmazó 1 cm^3-es küvettához adva, és 25 °C-on termosztálva. A kezdeti lineáris reakciósebességet spektrofotometriásan követjük a p-nitro-anilin reakciótermék abszorbanciájának nyomon követésével 410 nm-en az idő függvényében.

A felezési időt – azt az időtartamot, amely az enzim 50%-ának inaktiválásához szükséges – a 60 °C-os inkubáció időfüggvényében mért reakciósebesség elsőrendű görbéjéből határozzuk meg.

Az adatokat a 6. táblázatban mutatjuk be a *Bacillus lentus* szubtilizinhez (GG36) képest a felezési idő %-ában, azonos körülmények között meghatározva.

5. táblázat

Enzim	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
B. lentus szubtilizin	170	0,78	2,20E+05
N76D/S103G/V104I*	380	1,4	2,70E+05
N76D/S103A/V104F	730	0,33	2,20E+06
N76D/S103A/V104N	790	2,8	2,80E+05
N76D/S103A/V104S	170	0,83	2,00E+05
N76D/S103A/V104T	370	1,9	2,00E+05
N76D/S103A/V104W	880	0,31	2,80E+06
N76D/S103A/V104Y	690	0,5	1,40E+06
K27R/N76D/V104Y/N123S	500	1,2	4,20E+05
N76D/S101G/S103A/V104I*	620	1,3	4,80E+05
N76D/S103A/V104I/S105A*	550	1,3	4,20E+05
N76D/S103A/V104I/S105D*	440	1,7	2,60E+05
N76D/S103A/V104T/I107A*	120	5,7	2,10E+04
N76D/S103A/V104T/I107L*	310	3,2	9,70E+04
N76D/S103A/V104I/L126A	90	2,2	4,10E+04
N76D/S103A/V104I/L126F	180	1,9	9,50E+04
N76D/S103A/V104I/L126I	100	2,4	4,20E+04
N76D/S103A/V104I/L126V	64	3,2	2,00E+04
N76D/S103A/V104I/S128G*	560	1,7	3,30E+05

5. táblázat (folytatás)

Enzim	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
N76D/S103A/V104I/S128L*	430	3,8	1,10E+05
N76D/S103A/V104I/L135A	140	0,76	1,80E+05
N76D/S103A/V104I/L135F	390	0,69	5,70E+05
N76D/S103A/V104I/L135I	110	0,73	1,50E+05
N76D/S103A/V104I/L135V	140	0,86	1,60E+05
N76D/S103A/V104I/S156E*	170	2,6	6,50E+04
N76D/S103A/V104I/S166D*	160	3,5	4,60E+04
N76D/S103A/V104I/D197E	510	1,4	3,60E+05
N76D/S103A/V104I/N204A*	530	1,1	4,80E+05
N76D/S103A/V104I/N204G*	580	1,4	4,10E+05
N76D/S103A/V104I/N204C*	370	1,3	2,90E+05
N76D/S103A/V104I/P210I*	500	1,2	4,20E+05
N76D/S103A/V104I/L217H*	80	0,63	1,30E+05
N76D/S103A/V104I/M222A	70	3,1	2,30E+04
N76D/S103A/V104I/M222S	80	3,1	2,60E+04
N76D/S103A/V104I/T260P	660	1,5	4,40E+05
N76D/S103A/V104I/S265N	590	1,3	4,50E+05
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	220	1,4	1,60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	430	1,1	3,90E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	400	1,1	3,60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	440	1,2	3,70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1,2	3,70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	760	0,98	7,80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	410	1,2	3,40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	390	1	3,90E+05
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	170	2,1	8,10E+04
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	40	6,3	6,40E+03
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	410	0,98	4,20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	540	0,66	8,20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0,79	9,80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0,99	6,20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0,78	7,40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6,60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0,89	6,60E+05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5,20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0,65	7,10E+05
B. amyloliquefaciens szubtilizin (BPN')	50	0,14	3,60E+05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0,46	8,30E+05

* Ezek a mutánsok a fágmidból létrehozott egyszálú DNS-templáttal történő oligonukleotid irányította mutagenezissel készülnek, az összes többi az előbbiekben leírt oligonukleotid irányította mutagenezissel.

6. táblázat

Enzim	Hőstabilitás (a natív enzim felezési idejének %-ában)
B. lentus szubtilizin	100
N76D	590
N76D/S99D	840
N76D/S103A	390
N76D/V104I	660
N76D/I107V	710
N76D/N123S	70
N76D/S99D/S101R	610
N76D/S99D/S103A	590
N76D/S99D/V104I	910
N76D/S101R/S103A	930
N76D/S101R/V104I	500
N76D/S103A/V104I	460
N76D/S103G/V104I*	370
N76D/S103A/V104F	480
N76D/S103A/V104N	230
N76D/S103A/V104S	230
N76D/S103A/V104T	370
N76D/S103A/V104W	280
N76D/S103A/V104Y	400
N76D/V104I/I107V	940
N76D/V104Y/I107V	820
N76D/V104I/N123S	80
N76D/I107V/N123S	150
K27R/N76D/V104Y/N123S	100
N76D/S99D/S101R/S103A	570
N76D/S99D/S101R/V104I	1000
N76D/S99D/S103A/V104I	680
N76D/S101G/S103A/V104I*	390
N76D/S101R/S103A/V104I	470
N76D/S103A/V104I/S105A*	360
N76D/S103A/V104I/S105D*	370
N76D/S103A/V104T/I107A*	270
N76D/S103A/V104T/I107L*	230
N76D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/V104I/I107V/N123S	220
N76D/S103A/V104I/L126A	270
N76D/S103A/V104I/L126F	950
N76D/S103A/V104I/L126I	410
N76D/S103A/V104I/L126V	320
N76D/S103A/V104I/S128G*	640
N76D/S103A/V104I/S128L*	760

Enzim	Hőstabilitás (a natív enzim felezési idejének %-ában)
N76D/S103A/V104I/L135A	230
N76D/S103A/V104I/L135F	200
N76D/S103A/V104I/L135I	510
N76D/S103A/V104I/L135V	500
N76D/S103A/V104I/S156E*	120
N76D/S103A/V104I/S166D*	590
N76D/S103A/V104I/D197E	460
N76D/S103A/V104I/N204A*	230
N76D/S103A/V104I/N204G*	240
N76D/S103A/V104I/N204C*	500
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370
N76D/S103A/V104I/L217H*	60
N76D/S103A/V104I/M222A	520
N76D/S103A/V104I/M222S	490
N76D/S103A/V104I/T260P	490
N76D/S103A/V104I/S265N	360
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	40
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	60
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	810
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/ /G197E	90
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/ /N218S	250
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/ /N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/ /N218S	460
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/ /N218S	1400
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/ /T260P	310
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/ /T274A	180
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/ /N123S	90

6. táblázat (folytatás)

Enzim	Hőstabilitás (a natív enzim felezési idejének %-ában)
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/ /N218S/T274A	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/ /D197E/N218S	240
B. amyloliquefaciens szubtilizin (BPN')	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

* Ezek a mutánsok a fágmidból létrehozott egyszálú DNS-templáttal történő oligonukleotid irányította mutagenezissel készülnek, az összes többi az előbbiekben leírt oligonukleotid irányította mutagenezissel.

3. *Tisztítókészítmények anyagai*

A találmány szerinti tisztítókészítmények az előbbiekben leírt proteázenzimeken kívül egy vagy több, a proteázenzimmel összeegyeztethető tisztítószert is tartalmaznak. A „tisztítókészítmények anyagai" kifejezés ahogyan itt használjuk, bármilyen – a kívánt tisztítókészítmény típusa számára kiválasztott – folyékony, szilárd vagy gáznemű anyagot jelent, és a termék formája (például folyadék; granulátum; spray-készítmény) attól függ, hogy melyek azok az anyagok, amelyek a készítményben használt proteázenzimmel is összeegyeztethetők. A tisztítókészítmények anyagainak specifikus kiválasztása gyorsan megy a tisztítandó dolog vagy szövet felszínének és a készítménynek a használat közbeni tisztítási körülményekhez megkívánt formája (például detergens használata a mosás során) figyelembevételével. Az „összeegyeztethető" kifejezés ahogyan itt használjuk, a tisztítókészítmények olyan anyagait jelenti, amelyek a proteázenzim proteolitikus aktivitását nem csökkentik olyan mértékben, hogy a proteáz ne legyen a kívánt mértékben hatásos normál felhasználásoknál. Specifikus tisztítókészítmény-anyagokat részleteiben szemléltetünk az alábbiakban.

Egy vagy több fent leírt proteázenzim hatásos mennyiségét tartalmazzák fehérje eredetű folt eltávolítását igénylő, különböző felületek tisztítására használható készítmények. Az ilyen tisztítókészítmények tartalmaznak detergens készítményeket kemény felületek tisztítására, alaki korlátozás nélkül (például folyékony és granulált); detergens készítményeket szövetek tisztítására, alaki korlátozás nélkül (például granulált, folyékony és darabos formában); edénymosogató készítményeket (alaki korlátozás nélkül); szájápolási készítményeket, alaki korlátozás nélkül (például fogpor, fogpaszta és szájöblítő formulák); és fogsortisztító készítményeket, alaki korlátozás nélkül (például folyadék, tabletta). Ahogyan itt használjuk, a „proteázenzim hatékony mennyisége" az előbbiekben leírt proteázenzim olyan mennyiségére utal, amely a specifikus tisztítókészítményben a szükséges enzimaktivitás eléréséhez elengedhetetlen. Az ilyen hatásos mennyiségeket gyorsan megállapítja, aki a szakterületen jártas, és ez sok összetevőn alapul, úgymint az egyes felhasznált enzimváltozaton, a tisztítási alkalmazáson, a tisztítókészítmény specifikus készítményén és vagy egy folyékony vagy száraz (például granulált, darabos) készítményen és hasonlókon.

A találmány szerinti tisztítókészítmények előnyösen körülbelül 0,0001–10% egy vagy több proteázenzimet, előnyösebben körülbelül 0,001–1%-ot, még előnyösebben körülbelül 0,001–0,1%-ot tartalmaznak. Szintén előnyösen a proteázenzim a készítményekben olyan mennyiségben van jelen, amely elegendő a készítmény 100 g-jára vonatkoztatott mg aktív proteáz és a mosófolyadékban levő peroxisavból ppm-ben megadott elméleti felhasználható oxigén (AvO_2) olyan arányának – itt enzim:fehérítő arányként említve (E/B=enzyme/ /bleach) – biztosításához, amely körülbelül 1:1 és körülbelül 20:1 közé esik. Néhány példát különböző tisztítókészítményekre, amelyekben alkalmazhatjuk a proteázenzimeket, az alábbiakban részletesen tárgyalunk. Minden itt alkalmazott rész, százalék és arány tömegre vonatkozik, kivéve ha másképpen jelezzük.

(i) *Adott esetben alkalmazott tisztítóenzimek*

Az itt leírt készítmények és módszerek a specifikus proteázenzimeken felül mindenféle tisztítóenzimmel hatékonyak. A találmányban alkalmazható tetszés szerinti tisztítóenzimek beletartozhatnak szövetmosási célok széles körébe – beleértve például fehérjealapú, szénhidrátalapú vagy trigliceridalapú foltok eltávolítását – és nehezen kezelhető színátvitel megakadályozásába. A beépítendő enzimek közé tartoznak egyéb proteázok, amilázok, lipázok, cellulázok és peroxidázok ugyanúgy, mint ezek keverékei. Enzimek más típusai is idetartozhatnak. Ezek bármilyen alkalmas eredetűek lehetnek, úgymint növényi, állati, baktérium, gomba és élesztő eredetűek. Kiválasztásukat azonban meghatározza néhány faktor, úgymint aktivitási és/vagy stabilitási pH-optimum, hőstabilitás, aktív detergensekkel, mosószerépítőkkel stb. szembeni stabilitás. Ebben a vonatkozásban baktérium- vagy gombaenzimeket részesítünk előnyben, úgymint baktériumamilázokat és -proteázokat és gombacellulázokat.

Az enzimeket általában olyan mennyiségben építjük be, amely a detergens készítmény grammjára vonatkoztatott legfeljebb körülbelül 50 mg, jellemzőbben körülbelül 0,01–10 mg aktív enzim biztosításához elegendő. Másképpen fogalmazva, a találmányban felhasznált tetszés szerinti enzimek hatásos mennyisége a detergens készítménynek jellemzően legalább körülbelül 0,001%-át, előnyösen körülbelül 0,001–5%-át, előnyösebben körülbelül 0,001–1%-át, legelőnyösebben 0,01–1%-át teszi ki tömegszázalékban.

A szabadon választható proteázokra alkalmas példák a szubtilizinek, amelyeket *B. subtilis* és *B. licheniformis* egyes törzseiből nyerünk. Egy másik megfelelő proteáz *Bacillus subtilis*ből vagy *Bacillus licheniformis*ból nyert módosított bakteriális szerin-proteázenzim, amely 8–12-ig terjedő pH-tartományban maximális aktivitással rendelkezik, a Novo Industries A/S fej-

lesztette ki és forgalmazza ESPERASE-ként bejegyzett kereskedelmi néven. Ennek az enzimnek és hasonló enzimeknek az elkészítését a Novo 1,243,784 számú nagy-britanniai szabadalmi leírása ír le. Egyéb kereskedelmileg hozzáférhető proteolitikus enzimek magukban foglalják azokat, amelyeket ALCALASE és SAVINASE (Novo Ind. A/S, Denmark) és MAXATASE (International Bio-Synthetics, Inc., The Netherlands) márkanéven forgalmaznak. Még további proteázok közé tartoznak a Protease A (lásd az 1985. január 9-én 130,756 számon nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentést) és Protease B (lásd az 1987. április 28-án benyújtott 87303761.8 sorozatszámú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentést és az 1985. január 9-én 130,756 számon nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentést, Bott et al.) és az itt „Protease C" néven említett, *Bacillus*ból származó alkalikus szerin-proteáz háromszoros változat, amelyben a 104. helyzetben a tirozint valin, a 123. helyzetben a szerint aszparagin, a 274. helyzetben az alanint treonin helyettesíti. Protease C-t a 90915958.4 számú európai szabadalmi leírás írja le, amely megfelel a WO 91/06637 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentésnek (1991. május 16.), amelyet itt referenciaként beépítettünk. Genetikailag módosított változatok, különösen a Protease C változatai szintén idetartoznak.

Amilázok magukban foglalnak például α-amilázokat, amelyeket a Novo 1,296,839 számú nagy-britanniai szabadalmi leírása ír le, RAPIDASE (International Bio-Synthetics, Inc.) és TERMAMYL (Novo Industries).

A találmányban használható cellulázok magukban foglalnak baktérium- és gombacellulázokat egyaránt. Ezek előnyösen 5 és 9,5 közötti pH-optimummal rendelkeznek. Alkalmas cellulázokat tesz közzé Barbesgoard és munkatársai az 1984. március 6-án megadott 4,435,307 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amely gombacellulázokat *Humicola insolens* és *Humicola* DSM 1800 törzsekből vagy az *Aeromonas* nemzetségbe tartozó, celluláz-212-t termelő gombából állítottak elő, és tengeri puhatestű *(Dolabella Auricula Solander)* hepatopankreászából kivont cellulázt. Szintén alkalmas cellulázokat tesznek közzé a GB–A–2,075,028; GB–A–2,095,275 számú és a DE–OS–2,247,832 számú szabadalmi iratokban.

Tisztítási felhasználáshoz alkalmas lipázenzimek magukban foglalják azokat, amelyeket a *Pseudomonas* nemzetség mikroorganizmusai – úgymint *Pseudomonas stutzeri* ATCC 19154 – termelnek, ahogyan azt az 1,372,034 számú brit szabadalmi leírásban közzéteszik. Lásd még az 1978. február 24-én az 53-20487 számon közzétett japán szabadalmi bejelentést. Ez a lipáz hozzáférhető az Amano Pharmaceutical Co. Ltd. (Nagoya, Japan) forgalmazásában Lipase P „Amano" márkanéven, a továbbiakban „Amano-P"-nek nevezve. Egyéb kereskedelmi lipázok közé tartoznak az Amano-CES, *Chromobacter viscosum*ból, például *Chromobacter viscosum var. lipolyticum* NRRLB 3673 törzsből való lipázok, amelyek kereskedelmileg beszerezhetők a Toyo Jozo Co. (Tagata, Japan) cégtől; és további *Chromobacter viscosum* lipázok az U. S. Biochemical Corp. (USA) és Disoynth Co. (The Netherlands) cégektől és *Pseudomonas gladioli* lipázok. A *Humicola lanuginosa* gombából származó és *Aspergillus oryzae*-ben, mint gazdaszervezetben kifejezett LIPOLASE enzim – amely kereskedelmileg beszerezhető a Novo cégtől (lásd még a 341,947 számú európai szabadalmi leírást) – előnyben részesített lipáz itteni felhasználáshoz.

Peroxidázenzimeket oxigénforrásokkal, például perkarbonáttal, perboráttal, perszulfáttal, hidrogén-peroxiddal stb. kombináltan használunk. Ezeket „oldatfehérítésre", azaz a mosási műveletek során a szubsztrátokból eltávolított színanyagok vagy pigmentek más szubsztrátokra történő átvitelének megakadályozására használjuk a mosóoldatban. Peroxidázenzimek ismertek a szakmában, és felölelik például a torma-peroxidázt, ligninázt és halo-peroxidázt, úgymint kloro- és bromo-peroxidázokat. Peroxidáztartalmú tisztítókészítményeket tesznek közzé például az 1989. október 19-én nyilvánosságra hozott WO 89/099813 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben (Kirk O., átruházva a Novo Industries A/S-nek).

Enzimanyagok széles körét és szintetikus detergens szemcsékbe történő beépítésükhöz eszközöket tesznek közzé McCarty és munkatársai az 1971. január 5-én megadott U. S. P. 3,553,139 számú szabadalmi iratban. Enzimeket tesznek közzé továbbá Place és munkatársai az 1978. július 18-án megadott U. S. P. 4,101,457 számú és Hughes az 1985. március 26-án megadott U. S. P. 4,507,219 számú szabadalmi iratban. Folyékony tisztítókészítményekben használható enzimanyagokat és ezek beépítését ilyen formulákba tesznek közzé Hora és munkatársai az 1981. április 14-én megadott U. S. P. 4,261,868 számú szabadalmi iratban. Detergensekben felhasználásra kerülő enzimek különböző technikákkal stabilizálhatók. Enzimstabilizációs technikákat tesznek közzé és szemléltetnek Hora és munkatársai az 1981. április 14-én megadott U. S. P. 4,261,868 számú, Gedge és munkatársai az 1971. augusztus 17-én megadott U. S. P. 3,600,319 számú szabadalmi iratban és a Venegas által 1986. október 29-én közzétett 0199405 közzétételi számú, 86200586.5 bejelentési számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentésben. Enzimstabilizáló rendszereket írnak le például az U. S. P. 4,261,868, 3,600,319 és 3,519,570 számú szabadalmi iratok is.

(ii) *Enzimstabilizátorok*

Az itt alkalmazott enzimek stabilizálhatók kalciumionok vízoldható forrásainak jelenlétével az elkészült készítményekben, amelyek az enzimek számára kalciumionokat biztosítanak. További stabilitás biztosítható különböző egyéb, a szakma által közzétett stabilizátorok jelenlétével, különösen borátokkal, lásd a fent hivatkozott U. S. P. 4,537,706 számú szabadalmi iratot (Severson). Tipikus detergensek, különösen folyadékok 1–30, előnyösen 2–20, előnyösebben 5–15 és legelőnyösebben 8–12 mmol kalciumiont tartalmaznak a befejezett készítmény literjére vonatkoztatva. Ez valamelyest változhat a jelen levő enzim mennyiségétől és a kalciumionokra adott válaszától függően. A kalciumion-szintet úgy kell megválasztani, hogy a mosó-

szerépítőkkel, zsírsavakkal stb. történő komplexképzés lehetővé tétele után a készítményben mindig legyen egy minimális hozzáférhető szint az enzim számára. Bármilyen vízoldható kalciumsó használható kalciumion-forrásként, beleértve, de korlátozást nem jelentve a kalcium-kloridot, kalcium-szulfátot, kalcium-malátot, kalcium-hidroxidot, kalcium-formiátot és kalcium-acetátot. Kis mennyiségű kalciumion, általában 0,05–0,4 mmol/l gyakran jelen van a készítményben az enzimszuszpenzióban és a készítményhez használt vízben levő kalciumnak köszönhetően. Szilárd tisztítókészítményekben a formulázásba beletartozhat elegendő mennyiségű vízoldható kalciumion-forrás ilyen mennyiségek biztosítására a mosófolyadékban. Másképpen, a természetes vízkeménység elegendő lehet.

Az itt leírt készítmények adott esetben, de előnyösen tartalmazhatnak különböző további stabilizátorokat, beleértve szilikátbevonatokat és különösen borát típusú stabilizátorokat. Az ilyen stabilizátorokat a készítményekben jellemzően 0,25–10%, előnyösen 0,5–5%, előnyösebben 0,75–3% bórsav vagy egyéb, a készítményben bórsav képzésére képes borátvegyület (bórsavra számítva) tömegszázalékában alkalmazzuk. Előnyben részesítjük a bórsavat, jóllehet más vegyületek, úgymint bór-oxid, bórax és egyéb alkálifém-borátok (például (nátrium-orto-meta-, és -piroborát és nátrium-pentaborát) megfelelőek. Szubsztituált bórsavak (például fenil-boronsav, bután-boronsav és p-bromo-fenil-boronsav) szintén használhatók bórsav helyett.

(iii) *Tisztító felületaktív anyag*

A találmány által nyújtott, teljesen formulázott tisztítókészítménybe beletartozó tisztító felületaktív anyag mennyisége körülbelül 1–99,8% között változhat az egyes alkalmazott felületaktív anyagoktól és az elérendő hatástól függően. A tisztító felületaktív anyagok a tisztító-összetevőknek előnyösen körülbelül 5–80% tömegszázalékát teszik ki.

A tisztító felületaktív anyag lehet nemionos, anionos, amfolitikus, ikerionos vagy kationos. Ezeknek a felületaktív anyagoknak a keverékei is használhatók. Előnyben részesített tisztítókészítmények anionos felületaktív anyagokat tartalmaznak, vagy anionos felületaktív anyagoknak egyéb – különösen nemionos – felületaktív anyagokkal alkotott keverékét.

Korlátozást nem jelentő példák az itt használható felületaktív anyagokra magukban foglalják a hagyományos C_{11}–C_{18}-alkil-benzolszulfonátokat és primer, szekunder és random alkil-szulfátokat, a C_{10}–C_{18}-alkil-alkoxi-szulfátokat, a C_{10}–C_{18}-alkil-poliglikozidokat és az ezeknek megfelelő szulfatált poliglikozidokat, C_{12}–C_{18}-alfa-szulfonált zsírsav-észtereket, C_{12}–C_{18}-alkil- és alkil-fenol-alkoxilátokat (különösen etoxilátokat és kevert etoxi-/propoxilátokat), C_{12}–C_{18} betainokat és szulfobetainokat („szultainokat"), C_{10}–C_{18}-amin-oxidokat, C_8–C_{24} szarkozinátokat (különösen oleoszarkozinátot) és hasonlókat. Egyéb hagyományos felhasználható felületaktív anyagokat standard szövegekben sorolunk fel.

A nemionos felületaktív anyagoknak egy különleges osztálya, amely itt felhasználható, magában foglalja a (XVII) általános képletű polihidroxi-zsírsavamidokat, amelyekben az R^1 H, C_1–C_8-hidrokarbil-, 2-hidroxi-etil-, 2-hidroxi-propil- vagy ezek keveréke, előnyösen C_1–C_4-alkil-, előnyösebben C_1- vagy C_2-alkil-, legelőnyösebben C_1-alkil- (azaz metil-); és R^2 C_5–C_{32}-hidrokarbil-rész, előnyösen egyenes szénláncú C_7–C_{19}-alkil-, vagy alkenil-, előnyösebben egyenes szénláncú C_9–C_{17}-alkil-, vagy alkenil-, még előnyösebben egyenes szénláncú C_{11}–C_{19}-alkil-, vagy alkenilcsoport vagy ezek keveréke; és Z lineáris hidrokarbillánccal rendelkező polihidroxi-hidrokarbil-rész, amelyben legalább 2 hidroxil (gliceraldehid esetében) vagy legalább 3 hidroxil (más redukálócukrok esetében) közvetlenül kapcsolódik a lánchoz, vagy ezek alkoxilált (előnyösen etoxilált vagy propoxilált) származéka. Z előnyösen redukált cukorból származik reduktív aminálási reakcióval; előnyösebben Z glicitilrész. Alkalmas redukálócukrok közé tartozik a glükóz, fruktóz, maltóz, laktóz, galaktóz, mannóz és xilóz ugyanúgy, mint a gliceraldehid. Nyersanyagként ugyanúgy felhasználható nagy dextróztartalmú gabonaszirup, nagy fruktóztartalmú gabonaszirup és nagy maltóztartalmú gabonaszirup, mint a fent felsorolt egyes cukrok. Ezek a gabonaszirupok cukorkomponensek keverékét nyújthatják Z-hez. Hangsúlyozzuk, hogy ez semmi esetre sem jelenti más, alkalmas nyersanyagok kizárásának szándékát. Z-t előnyösen a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: $-CH_2-(CHOH)_n-CH_2OH$, $-CH(CH_2OH)-(CHOH)_{n-1}-CH_2OH$, $-CH_2-(CHOH)_2(CHOR')(CHOH)-CH_2OH$, ahol n 1 és 5 közötti egész szám, és R' H vagy ciklikus mono- vagy poliszacharid és ezek alkoxilált származéka. Leginkább előnyben részesítjük a glicitileket, amelyekben n 4, különösen a $-CH_2-(CHOH)_4-CH_2OH$-t.

A (XVII) általános képletű vegyületben R^1 lehet például N-metil-, N-etil-, N-propil-, N-izopropil-, N-butil-, N-izobutil-, N-2-hidroxi-etil- vagy N-(2-hidroxi-propil)-csoport. Legerősebb habzáshoz R^1 előnyösen metil- vagy hidroxi-alkil-csoport. Ha mérsékeltebb habzást kívánunk, R^1 előnyösen C_2–C_8-alkil-, különösen propil-, izopropil-, butil-, izobutil-, pentil-, hexil- és 2-etil-hexil-csoport.

R^2–CO–N< például lehet kókuszamid, sztearinsavamid, olajsavamid, laurinsavamid, mirisztinsavamid, kapronsavamid, palmitinsavamid, faggyúamid stb.

A találmányban különösen hasznos nemionos felületaktív anyagoknak egy másik osztályát az etilén-oxidnak olyan hidrofób résszel képzett kondenzátumai képezik, amelyek 5–17, előnyösen 6–14, még előnyösebben 7–12 átlagos hidrofil-lipofil egyensúllyal (HLB-értékkel) rendelkező felületaktív anyagot szolgáltatnak. A hidrofób (lipofil) rész lehet alifás vagy aromás természetű és a bármelyik hidrofób csoporttal kondenzált poli(oxi-etilén)-csoport hosszát könnyen beállíthatjuk olyan vízoldható vegyület létrehozásához, amely a hidrofil és hidrofób elemek közötti kívánt fokú egyensúllyal rendelkezik.

Különösen előnyben részesített ilyen típusú nemionos felületaktív anyagok az alkohol mólonként 3–8 mol etilén-oxidot tartalmazó C_9–C_{15} primer al-

kohol-etoxilátok, különösen az alkohol mólonként 6–8 mol etilén-oxidot tartalmazó C_{14}–C_{15} primer alkohol-etoxilátok, az alkohol mólonként 3–5 mol etilén-oxidot tartalmazó C_{12}–C_{15} primer alkohol-etoxilátok és ezek keverékei.

(iv) *Tisztító mosószerépítők*

A találmányban alkalmazott szabadon választható tisztító-összetevők szervetlen és/vagy szerves tisztító mosószerépítőket tartalmaznak az ásványi keménység ellenőrzésének elősegítésére. Ha alkalmazzuk, ezek a mosószerépítők a tisztítókészítményeknek 5–80 tömegszázalékát teszik ki.

Szervetlen tisztító mosószerépítők közé tartoznak – de nem korlátozódnak ezekre – polifoszfátok alkálifém-, ammónium- és alkanol-ammónium-sói (amelyeket a tri-polifoszfátok, pirofoszfátok és üvegszerű polimer metafoszfátok példáznak), foszfonátok, fitinsav, szilikátok, karbonátok (beleértve a di- és szeszkvikarbonátokat), szulfátok és alumínium-szilikátok. Némely helyen azonban nem foszfát mosószerépítők szükségesek.

A szilikát mosószerépítőkre példák az alkálifém-szilikátok, különösen azok, amelyeknek SiO_2:Na_2O aránya 1,6:1 és 3,2:1 között mozog és rétegelt szilikátok, úgymint az 1987. május 12-én megadott U. S. P. 4,664,839 számú szabadalmi iratban leírt rétegelt nátrium-szilikátok, amelyek hozzáférhetőek „SKS" márkanéven a Hoechst-től, az SKS-6 egy különösen előnyben részesített rétegelt szilikát mosószerépítő.

Karbonát mosószerépítők – különösen a 10 m^2/g-nál nagyobb fajlagos felületű, finom felszínű kalcium-karbonát – előnyben részesített mosószerépítők, amelyek granulált készítményekben használhatók. Az ilyen alkálifém-karbonát detergens mosószerépítők sűrűsége 450–850 g/l tartományban mozoghat, előnyösen 4%-nál kevesebb nedvességtartalommal.

Karbonát mosószerépítőkre példák az alkáliföldfém- és alkálifém-karbonátok, ahogyan azt az 1973. november 15-én közzétett 2,321,001 számú német szövetségi köztársaságbeli szabadalmi bejelentés feltárja.

Alumínium-szilikát mosószerépítők különösen hasznosak a találmányban. Előnyben részesített alumínium-szilikátok a $Na_z[(AlO_2)_z(SiO_2)_y]xH_2O$ általános képlettel rendelkező zeolit mosószerépítők, amelyekben z és y 6 vagy 6-nál nagyobb egész számok, z:y mólaránya 1,0-től 0,5-ig terjed, és x 15–264 közötti egész szám.

Alkalmas alumínium-szilikát ioncserélő anyagok kereskedelemben hozzáférhetők. Ezek az alumínium-szilikátok lehetnek kristályosak vagy amorf szerkezetűek és lehetnek természetben előforduló alumínium-szilikátok vagy szintetikus származékok. Alumínium-szilikát ioncserélő anyagok előállítására szolgáló módszereket tesznek közzé Krummel és munkatársai az 1976. október 12-én megadott U. S. P. 3,985,669 számú és Corkill és munkatársai az 1986. augusztus 12-én megadott U. S. P. 4,605,509 számú szabadalmi iratban. Itt használható előnyben részesített szintetikus kristályos alumínium-szilikát ioncserélő anyagok Zeolite A, Zeolite P (B) (beleértve az EP 384,070 számú szabadalmi iratban közzétetteket) és Zeolite X jelzéssel kaphatók. Az alumínium-szilikát előnyösen 0,1–10 μm átmérőjű szemcsemérettel rendelkezik.

A találmány céljainak megfelelő szerves tisztító mosószerépítők közé tartozik – de nem korlátozódik ezekre – a polikarboxilátvegyületek széles köre, úgymint polikarboxilát-éterek, beleértve az oxi-diszukcinátot, ahogyan azt Berg az 1964. április 7-én megadott U. S. P. 3,128,287 számú és Lamberti és munkatársai az 1972. január 18-án megadott U. S. P. 3,635,830 számú szabadalmi iratban közzétették. Lásd még a „TMS/TDS" mosószerépítőket az 1987. május 5-én megadott U. S. P. 4,663,071 számú szabadalmi iratban (Bush et al.). A megfelelő polikarboxilát-éterek ciklikus vegyületeket is magukban foglalnak, különösen aliciklusos vegyületeket, amilyeneket az U. S. P. 3,923,679; 3,835,163; 4,158,635; 4,120,874 és 4,102,903 számú szabadalmi iratok írnak le.

Egyéb alkalmas tisztító mosószerépítők közé tartoznak a hidroxi-karboxilát-éterek, maleinsavanhidridnek etilénnel vagy vinil-metil-éterrel képzett kopolimerjei, 1,3,5-trihidroxi-benzol-2,4,6-triszulfonsav, és karboxi-metil-oxi-borostyánkősav, a poliecetsavak különböző alkálifém-, ammónium- és szubsztituált ammóniumsói, úgymint etilén-diamin-tetraecetsav és nitrilo-triecetsav ugyanúgy, mint polikarboxilátok, úgymint mellitinsav, borostyánkősav, oxi-diborostyánkősav, polimaleinsav, benzol-1,3,5-trikarbonsav, (karboxi-metoxi)-borostyánkősav és ezek vízoldható sói.

Citrát mosószerépítők, például citromsav és ennek vízoldható sói (különösen nátriumsója) előnyben részesített polikarboxilát mosószerépítők, amelyek granulált készítményekben is használhatók, különösen zeolittal és/vagy rétegelt szilikáttal kombináltan.

A találmány szerinti tisztítókészítményekben szintén alkalmazhatók a 3,3-dikarboxi-4-oxa-1,6-hexándioátok és rokon vegyületei, amelyeket Bush és munkatársai tettek közzé az 1986. január 28-án megadott U. S. P. 4,566,984 számú szabadalmi iratban.

Olyan esetekben, amikor foszforalapú mosószerépítők alkalmazhatók, és különösen kézi mosási műveletekhez használt darabos készítményben, a különböző alkálifém-foszfátok, úgymint a jól ismert nátrium-trifoszfát, nátrium-pirofoszfát és nátrium-ortofoszfát alkalmazhatók. Foszfonát mosószerépítők, úgymint etán-1-hidroxi-1,1-difoszfonát és egyéb ismert foszfonátok szintén használhatók (lásd például az U. S. P. 3,159,581; 3,213,030; 3,422,021; 3,400,148 és 3,422,137 számú szabadalmi iratokat).

(v) *Adott esetben használt tisztító segédanyagok*

Előnyben részesített megvalósítási formaként az itt alkalmazott hagyományos tisztító-összetevőket tipikus tisztítókészítmény-komponensek közül választhatjuk ki, úgymint tisztító felületaktív anyagokból és tisztító mosószerépítőkből. Adott esetben a tisztító-összetevők tartalmazhatnak egy vagy több egyéb tisztító segédanyagot vagy más, a tisztítási teljesítmény, a tisztítandó szubsztrát kezelésének fokozását elősegítő, vagy a tisztítókészítmény ízlésességét módosító anyagot. A tisztítókészítmények általános tisztító segédanyagai közé tartoznak az U. S. P. 3,936,537 számú szabadalmi iratban

Baskerville és munkatársai által bemutatott összetevők, amelyeket itt referenciaként beépítettünk. Az ilyen segédanyagok – amelyek beletartozhatnak a találmányban alkalmazott tisztítókészítményekbe – a szokásos, tudományosan megállapított alkalmazási mennyiségekben (általában a tisztító-összetevőknek 0–20%-ában, előnyösen 0,5–10%-ában) tartalmaznak színezékfoltokat, habzáserősítőket, habzásgátlókat, homály és/vagy korrózió elleni szereket, szennyeződést szuszpendáló szereket, szennyeződést elengedő szereket, festékeket, töltőanyagokat, optikai élénkítőket, fertőtlenítőszereket, lúgosítókat, hidrotropokat, antioxidánsokat, parfümöket, oldószereket, oldhatóságot elősegítő szereket, agyagszennyeződést eltávolító/ lerakódást gátló szereket, polimer diszpergálószereket, segédanyagokat, szövetlágyító komponenseket (például smektitagyagokat), színátvitelt megakadályozó szereket [például poli(vinil-pirroldon)-t], statikus kontrollszereket stb.

Fehérítőrendszerek adott esetben, de előnyösen kelátképzőt is tartalmaznak, amely nemcsak a fehérítők stabilitást fokozza a fehérítők lebontására hajlamos nehézfémionok megkötésével, hanem polifenol természetű foltok – úgymint teafoltok és hasonlók – eltávolítását is elősegíti. Különböző kelátképzők, beleértve az aminofoszfonátokat, DEQUEST néven hozzáférhetők Monsantótól, a nitrilo-triacetátok, a hidroxi-etil-etilén-diamin-triacetátok és hasonlók ismertek ilyen célra. Előnyben részesített biológiailag lebontható nem foszfor kelátképzők közé tartoznak az etilén-diamin-diszukcinát („EDDS"; lásd az U. S. P. 4,704,233 számú szabadalmi iratot, Hartman és Perkins), etilén-diamin-N,N'-diglutamát- (EDDG) és 2-hidroxi-propilén-diamin-N,N'-diszukcinát- (HPDDS) vegyületek. Ilyen kelátképzők használhatók alkáli- vagy alkáliföldfémsók formájában, jellemzően a készítményeknek 0,1–10%-ában.

A találmány szerinti készítmények különösen hasznosak hagyományos mosó-tisztító készítményként, amelyek jellemzően granulált detergensek vagy darabos mosószerek formájában találhatók. Az 1965. április 13-án megadott U. S. P. 3,178,370 számú szabadalmi iratban Okenfuss darabos mosódetergenseket és azok előállítását teszi közzé. Az 1980. szeptember 23-án megadott 13,778 számú Fülöp-szigeteki szabadalmi leírásban Anderson szintetikus darabos mosódetergenseket tesz közzé. Darabos mosódetergensek előállítására szolgáló extrudálási módszerek jól ismertek a szakmában.

A találmányt tovább szemléltetjük a következő, az oltalmi kört semmiképp sem korlátozó példákkal.

1. példa

Granulált tisztítókészítmény, amely a következő összetevőket tartalmazza:

Összetevők	Tömegszázalék
Lineáris C_{12}-alkil-benzolszulfonát	22
Foszfát (nátrium-trifoszfát)	30
Nátrium-karbonát	14
Nátrium-szilikát	3
12. proteáz	0,3
Nátrium-perkarbonát	5
Etilén-diamin-diszukcinát kelátképző (EDDS)	0,4
Nátrium-szulfát	5,5
Nonanoil-kaprolaktám	5
Töltőanyag* és víz	100%-ra kiegészítve

* Megfelelő anyagok közül választható, úgymint $CaCO_3$, talkum, agyag, szilikátok és hasonlók közül.

A tisztítókészítmények hő- és alkáli stabil komponenseinek vizes alapkeverékeit elkészítjük és porlasztva szárítjuk, és az egyéb összetevőket úgy keverjük hozzájuk, hogy a táblázatban bemutatott mennyiségeket tartalmazzák.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

2. példa

Granulált tisztítókészítmény, amely a következő összetevőket tartalmazza:

Összetevők	Tömegszázalék
Anionos alkil-szulfát	7
Nemionos felületaktív anyag	5
Zeolit (0,1–10 μm)	10
Trinátrium-citrát	2
SKS-6 szilikát mosószerépítő	10
Akrilát-maleát polimer	4
Nonanoil-kaprolaktám	5
Nátrium-perkarbonát*	15
Nátrium-karbonát	5
Etilén-diamin-diszukcinát kelátképző (EDDS)	0,4
Habzásgátló	2
12. proteáz	0,3
Lipáz	0,3
Szennyeződést elengedő szer	0,2
Egyéb alkotórészek, töltőanyagok** és víz	100%-ra kiegészítve

* Átlagos részecskeméret 400–1200 μm.

** Megfelelő anyagok közül választható, úgymint $CaCO_3$, talkum, agyag, szilikátok és hasonlók közül.

A tisztítókészítmény hő- és alkáli stabil komponenseinek vizes alapkeverékeit elkészítjük és porlasztva szárítjuk, és az egyéb összetevőket úgy keverjük hozzájuk, hogy a táblázatban bemutatott mennyiségeket tartalmazzák.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

3. példa

A 2. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal a különbséggel, hogy a nonanoil-kaprolaktámot benzoil-kaprolaktám, nonanoil-kaprolaktám és (6-nonan-amido-kaproil)-oxi-benzolszulfonát 1:1:1 arányú keverékével helyettesítettük 15%-ban, és a nátrium-perkarbonát mennyiségét 30%-ra emeltük.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

4. példa

Az 1. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal a különbséggel, hogy a nonanoil-kaprolaktámot benzoil-kaprolaktám és [6-(nonán-amido)-kaproil-oxi]-benzolszulfonát 1:1 arányú keverékével helyettesítettük 20%-ban, a nátrium-perkarbonát mennyisége 20% és a foszfát mennyisége 0%.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

5. példa

A 2. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal az egyetlen különbséggel, hogy a nonanoil-kaprolaktámot ekvivalens mennyiségű benzoxazin típusú aktivátorral helyettesítettük.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

6. példa

A 2. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal a különbséggel, hogy a nonanoil-kaprolaktámot benzoxazin típusú aktivátor és tetraacetil-etilén-diamin 1:1 arányú keverékével helyettesítettük 10%-ban és a nátrium-perkarbonát mennyisége 25%.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

7. példa

Szennyezett szövetek kézi mosásához alkalmas darabos mosószer, amelyet standard extrudálási eljárással állítottunk elő, és a következőket tartalmazza:

Összetevők	Tömegszázalék
Lineáris C_{12}-alkil-benzolszulfonát	30
Foszfát (nátrium-trifoszfát)	7
Nátrium-karbonát	25
Nátrium-pirofoszfát	7
Kókuszdió-monoetanolamid	2
Zeolite A (0,1–10 μm)	5
(Karboxi-metil)-cellulóz	0,2
Poliakrilát (móltömeg 1400)	0,2
[6-(Nonán-amido)-kaproil-oxi]-benzolszulfonát	5
Nátrium-perkarbonát	5
Élénkítő, parfüm	0,2
12. proteáz	0,3**
Lipáz	0,3
$CaSO_4$	1
$MgSO_4$	1
Víz	4
Töltőanyag*	100%-ra kiegészítve

* Megfelelő anyagok közül választható, úgymint $CaCO_3$, talkum, agyag, szilikátok és hasonlók közül.

** mg aktív enzim/g készítmény.

A darabos mosószert hagyományos szappan- vagy darabosdetergens-gyártó készülékben állítjuk elő, ahogyan általában szokásos a szakmában.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban

leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

8. példa

A 7. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal az egyetlen különbséggel, hogy a [6-(nonán-amido)-kaproil-oxi]-benzolszulfonátot ekvivalens mennyiségű benzoil-kaprolaktámmal helyettesítettük.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

9. példa

A 7. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal az egyetlen különbséggel, hogy a (6-nonan-amido-kaproil)-oxi-benzolszulfonátot ekvivalens mennyiségű nonanoil-kaprolaktámmal helyettesítettük.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

10. példa

Granulált tisztítókészítmény, amely a következő összetevőket tartalmazza:

Összetevők	Tömegszázalék
Anionos alkil-szulfát	7
Nemionos felületaktív anyag	5
Zeolit (0,1–10 μm)	10
Trinátrium-citrát	2
SKS-6 szilikát mosószerépítő	10
Akrilát-maleát polimer	4
Nonanoil-kaprolaktám	5
Nátrium-perkarbonát*	15
Nátrium-karbonát	5
Etilén-diamin-diszukcinát kelátképző (EDDS)	0,4
Habzásgátló	2
12. proteáz	0,5
Szennyeződést elengedő szer	0,2
Egyéb alkotórészek, töltőanyagok** és víz	100%-ra kiegészítve

* Átlagos részecskeméret 400–1200 μm.

** Megfelelő anyagok közül választható, úgymint $CaCO_3$, talkum, agyag, szilikátok és hasonlók közül.

A tisztítókészítmény hő- és alkáli stabil komponenseinek vizes alapkeverékeit elkészítjük és porlasztva szárítjuk, és az egyéb összetevőket úgy keverjük hozzájuk, hogy a táblázatban bemutatott mennyiségeket tartalmazzák.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

11. példa

A 10. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal az egyetlen különbséggel, hogy a nonanoil-kaprolaktámot ekvivalens mennyiségű benzoil-kaprolaktámmal helyettesítettük.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

12. példa

A 10. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal a különbséggel, hogy a nonanoil-kaprolaktámot 15% (6-nonan-amido-kaproil)-oxi-benzolszulfonáttal helyettesítettük és a nátrium-perkarbonát mennyisége 30%.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

13. példa

A 10. példánál leírttal azonos eljárással elkészített tisztítókészítmény, azzal a különbséggel, hogy a nona-

noil-kaprolaktámot 15% benzoxazin típusú aktivátorral helyettesítettük és a nátrium-perkarbonát mennyisége 30%.

Ebben a példában a 3. táblázatban felsorolt 1–11. és 13–25. proteázok, többek között – beleértve a további, a találmány számára hasznos, az 5. és 6. táblázatban leírt proteázokat – a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket adnak. Szintén ebben a példában a 3., 5. és 6. táblázatban felsorolt, a találmány számára hasznos proteázenzimek bármilyen kombinációja, többek között, a 12. proteázt helyettesítve lényegében hasonló eredményeket ad.

14. példa

Mosásiteljesítmény-teszt

A találmány szerinti készítményekben használható változatok mosási teljesítményét EMPA 116 szövetmintákból (Testfabrics, Inc., Middlesex, NJ 07030) történő folteltávolítás (vér/tej/feketeszén pamuton) mérésével értékeljük.

Hat darab 3×4–1/2 inch méretűre vágott, átszúrt szélű EMPA 116 szövetmintát teszünk egy Model 7243S Terg-O-Tometer mindegyik edényébe, amelyek 1000 ml 15 gpg keménységű vizet (Ca^{2+}:Mg^{2+}=3:1 tömegarányban), 7 g detergenst és megfelelő enzimet tartalmaznak. A detergens alap WFK1 detergens (a Testgewebe GmbH-tól, Adlerstrasse 42, Pf. 130762, D–47759 Krefeld, Germany):

Komponens	A végső formula %-ában
Zeolit A	25
Na-szulfát	25
Szódahamu	10
Lineáris alkil-benzolszulfonát	8,8
Etoxilált alkohol (7–8 EO)	4,5
Na-szappan	3
Na-szilikát (SiO_2:Na_2O=3,3:1)	3

Ehhez a detergens bázishoz a következőket adjuk:

Komponens	A végső formula %-ában
Na-perborát-monohidrát	13
Kopolimer (Sokalan CP5)	4
TAED (Mykon ATC Green)	3
Enzim	0,5
Színélénkítő (Tinopal AMS-GX)	0,2

Nátrium-perborát-monohidrátot a Degussa Corporationtől (Ridgefield-Park, NJ 07660), Sokalan CP5-öt a BASF Corporationtől (Parsippany, NJ 07054), Mykon ATC Greent (TAED=tetraacetil–etilén-diamint) a Warwick International Limitedtől (Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, England), Tinopal AMS-GX-et a Ciba-Geigy Corporationtől (Greensboro, NC 27419) szereztünk be.

Hat EMPA 116 mintát mosunk enzimmel kiegészített mosószerben 30 percig 60 °C-on és mindjárt utána kétszer 5 percig öblítjük, mindkét esetben 1000 ml vízben. Enzimet adunk 0,05-től 1 ppm végső koncentrációig a standard görbe felvételéhez és 0,25 ppm-et rutinanalízisekhez. A mintadarabokat megszárítjuk és préseljük, és a mintadarabokról történő visszaverődést mérjük a Minolta Chroma Meter, CR-200 modelljének (Minolta Corp, Ramsey, NJ 07446) Lab scale változatán az L érték alkalmazásával. A teljesítményt a *B. lentus* (GG36) proteáz teljesítményének százalékában adjuk meg, és oly módon számítjuk ki, hogy a *B. lentus* (GG36) proteáz mennyiségét elosztjuk a proteázváltozatnak azon mennyiségével, amely ugyanolyan folteltávolítási teljesítmény eléréséhez szükséges, és szorozzuk 100-zal. Az adatokat a 7. táblázatban mutatjuk be.

7. táblázat

Enzim	Mosási teljesítmény
B. lentus szubtilizin	100
N76D	310
N76D/S103A	230
N76D/V104I	130
N76D/V107V	160
N76D/S99D/S101R	370
N76D/S99D/S103A	290
N76D/S101R/S103A	130
N76D/S101R/V104I	300
N76D/S103A/V104I	320
N76D/S103G/V104I	160
N76D/S103A/V104F	210
N76D/S103A/V104N	110
N76D/S103A/V104T	170
N76D/V104I/I107V	210
N76D/S99D/S101R/S103A	220
N76D/S99D/S101R/V104I	140
N76D/S101G/S103A/V104I	170
N76D/S101R/S103A/V104I	150
N76D/S103A/V104I/S105A	170
N76D/S103A/V104T/I107A	120
N76D/S103A/V104T/I107L	110
N76D/S103A/V104I/L126F	110
N76D/S103A/V104I/S128G	280
N76D/S103A/V104I/L135I	160
N76D/S103A/V104I/L135V	160
N76D/S103A/V104I/D197E	170
N76D/S103A/V104I/N204A	160
N76D/S103A/V104I/N204G	150
N76D/S103A/V104I/P210I	470
N76D/S103A/V104I/M222A	100

7. táblázat (folytatás)

N76D/S103A/V104I/T260P	280
N76D/S103A/V104I/S265N	190

SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE

Az 1. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 19 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) Az 1. számú szekvencia leírása:

GAAGCTGCAA CTCGTTAAA 19

A 2. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 18 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 2. számú szekvencia leírása:

GCTGCTCTAG ACAATTCG 18

A 3. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 39 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 3. számú szekvencia leírása:

GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT 39

A 4. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 33 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 4. számú szekvencia leírása:

TCAGGTTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG 33

Az 5. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 22 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) Az 5. számú szekvencia leírása:

CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG 22

A 6. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 1497 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 6. számú szekvencia leírása:

```
GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG   60
TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA  120
GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC  180
AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA  240
GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA  300
AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT  360
TGAAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GCGTACGCGC  420
AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA  480
CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT  540
TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA  600
ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT  660
TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAAAGT TCTCGGTGCT GACGGTTCCG  720
GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA  780
TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG  840
CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCGGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT  900
CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAAATACC CTTCTGTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA  960
GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG 1020
GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTTCCTGGAA ACAAATACGG GGCGTACAAC GGTACGTCAA 1080
TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA 1140
CAAACACTCA AGTCCGCAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT 1200
ACTATGGAAA AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAAACATA AAAAACCGGC 1260
CTTGGCCCCG CCGGTTTTTT ATTATTTTTC TTCCTCCGCA TGTTCAATCC GCTCCATAAT 1320
CGACGGATGG CTCCCTCTGA AAATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC 1380
CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT 1440
GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCCTGATA CCGGGAGACG GCATTCGTAA TCGGATC     1497
```

A 7. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 275 aminosav
(B) Típusa: aminosav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: fehérje
(xi) A 7. számú szekvencia leírása:

```
Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1               5                  10                  15
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
            20                  25                  30
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
        35                  40                  45
Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
    50                  55                  60
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65                  70                  75                  80
Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
                85                  90                  95
Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
            100                 105                 110
Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
        115                 120                 125
```

```
Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
    130                 135                 140
Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160
Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
                165                 170                 175
Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
            180                 185                 190
Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205
Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
    210                 215                 220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225                 230                 235                 240
Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
                245                 250                 255
Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
            260                 265                 270
Ala Ala Gln
        275
```

A 8. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossza: 275 aminosav
- (B) Típusa: aminosav
- (C) Szálasság: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: fehérje

(xi) A 8. számú szekvencia leírása:

```
Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1               5                   10                  15
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
            20                  25                  30
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala
        35                  40                  45
Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His
    50                  55                  60
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65                  70                  75                  80
Val Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
                85                  90                  95
Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
            100                 105                 110
Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
        115                 120                 125
Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser
    130                 135                 140
Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly
145                 150                 155                 160
Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala
                165                 170                 175
Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala
            180                 185                 190
Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205
Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr
    210                 215                 220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr
225                 230                 235                 240
```

```
Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr
                  245                 250                 255
Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
              260                 265                 270
Ala Ala Gln
          275
```

A 9. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 274 aminosav
(B) Típusa: aminosav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: fehérje
(xi) A 9. számú szekvencia leírása:

```
Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val
1               5                  10                  15
Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
            20                  25                  30
Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala
        35                  40                  45
Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly
    50                  55                  60
Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val
65                  70                  75                  80
Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
                85                  90                  95
Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
            100                 105                 110
Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala
        115                 120                 125
Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg
    130                 135                 140
Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser
145                 150                 155                 160
Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val
                165                 170                 175
Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly
            180                 185                 190
Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr
        195                 200                 205
Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro
    210                 215                 220
His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu
225                 230                 235                 240
Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
                245                 250                 255
Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
            260                 265                 270
Ala Gln
```

A 10. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 269 aminosav
(B) Típusa: aminosav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: fehérje
(xi) A 10. számú szekvencia leírása:

```
Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1               5                  10                  15
His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
            20                  25                  30
Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
        35                  40                  45
Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
    50                  55                  60
His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
65                  70                  75                  80
Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
                85                  90                  95
Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
            100                 105                 110
Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
        115                 120                 125
Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
    130                 135                 140
Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser
145                 150                 155                 160
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
                165                 170                 175
Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
            180                 185                 190
Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
        195                 200                 205
Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
    210                 215                 220
Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225                 230                 235                 240
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
                245                 250                 255
Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
            260                 265
```

A 11. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
  (A) Hossza: 1140 bázispár
  (B) Típusa: nukleinsav
  (C) Szálasság: egyszálú
  (D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 11. számú szekvencia leírása:

```
ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT   60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT  120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT  180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT  240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT  300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC  360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT  420
GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT  480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG  540
ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC  600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGTTCGGTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG  660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA  720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG  780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG  840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG  900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC  960
```

AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

A 12. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 1140 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 12. számú szekvencia leírása:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC 360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420
GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540
ATTGCTGCTT TAGACAACTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC 600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC 960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

A 13. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 30 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 13. számú szekvencia leírása:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT 30

A 14. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 31 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav
(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 14. számú szekvencia leírása:

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T 31

A 15. számú szekvencia adatai:

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossza: 33 bázispár
(B) Típusa: nukleinsav

(C) Szálasság: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) Molekulatípus: genomiális DNS
(xi) A 15. számú szekvencia leírása:
GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT 33

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fehérítőkészítmény, amely tartalmaz:
a) hatásos mennyiségű proteázenzimet, amely egy természetben elő nem forduló aminosavszekvenciával rendelkező karbonil-hidroláz-változat, amely egy szubtilizin prekurzor karbonil-hidrolázból származik helyettesítve a prekurzor karbonil-hidrolázban a +76. helyzetű aminosavmaradékot és egy vagy több aminosavmaradékot a +27., +99., +101., +103., +104., +105., +107., +109., +123., +126, +128., +135., +156., +166., +195., +197., +204., +206., +210., +216., +217., +218., +222., +260., +265. és/vagy +274. helyzetben, melyek ekvivalens helyzetűek a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizin aminosavmaradékaival; azzal a megkötéssel, hogy az enzimváltozatokban az együttes helyettesítések az alábbi helyettesítésektől eltérőek:
két aminosavhelyettesítés esetén: 76+109 vagy 76+218;
három aminosavhelyettesítés esetén: 76+109+218;
négy aminosavhelyettesítés esetén:
76+109+217+222 vagy 76+217+218+222;
öt aminosavhelyettesítés esetén:
76+109+217+218+222; és
b) fehérítőszert, amely egy szerves peroxisav vagy egy fehérítőaktivátor és egy, az aktivátorral reakcióba lépő, hidrogén-peroxid fejlesztésére képes peroxidvegyület kombinációja, amely *in situ* szerves peroxisavat képez a készítményből keletkező fehérítőoldatban; és
c) egy vagy több, a proteázenzimmel és fehérítőszerrel összeegyeztethető tisztítókészítmény-anyagot.

2. Az 1. igénypont szerinti fehérítőkészítmény, ahol a b) tisztítókészítmény-anyagok felületaktív anyagok, oldószerek, pufferek, enzimek, szennyeződést elengedő ágensek, agyagos talajt eltávolító ágensek, diszpergálószerek, színélénkítők, habzásgátlók, szövetlágyítók, habzást erősítők, enzimstabilizátorok, mosószerépítők, festékek, parfümök vagy ezek keverékei.

3. A 2. igénypont szerinti fehérítőkészítmény legalább egy felületaktív anyagot tartalmazó, szövettisztító készítményként alkalmazható formában.

4. A 3. igénypont szerinti fehérítőkészítmény, amely legalább 5 tömeg% felületaktív anyagot tartalmaz alkilbenzolszulfonátokat, primer alkil-szulfátokat, szekunder alkil-szulfátokat, alkil-alkoxi-szulfátokat, alkil-alkoxikarboxilátokat, alkil-poliglikozidokat és azoknak megfelelő szulfatált poliglikozidokat, alfa-szulfonált-zsírsavésztereket, alkil- és alkil-fenol-alkoxilátokat, betainokat és szulfobetainokat, amin-oxidokat, N-metil-glükamidokat, nemionos primer etoxilált alkoholokat, nemionos primer, kevert etoxi/propoxi alkoholokat és ezek keverékeit tartalmazó csoportból kiválasztva.

5. A 4. igénypont szerinti fehérítőkészítmény, amely tartalmaz továbbá legalább 5 tömeg% mosószerépítőt zeolitokat, polikarboxilátokat, rétegelt szilikátokat, foszfátokat és ezek keverékeit tartalmazó csoportból kiválasztva.

6. A 4. igénypont szerinti fehérítőkészítmény legalább 30 tömeg% felületaktív anyagot tartalmazó, koncentrált granulált szövettisztító készítmény formájában.

7. Az 1. igénypont szerinti fehérítőkészítmény, amelyben a b) tisztítókészítmény-anyagok tartalmaznak legalább egy enzimet a cellulázok, lipázok, amilázok, proteázok, peroxidázok vagy ezek keveréke közül.

8. Az 1. igénypont szerinti fehérítőkészítmény legalább egy oldószert és legalább egy felületaktív anyagot tartalmazó, folyékony szövettisztító készítményként alkalmazható formában.

9. A 8. igénypont szerinti fehérítőkészítmény, amely vizet és legalább 5 tömeg% felületaktív anyagot tartalmaz.

10. Az 1. igénypont szerinti fehérítőkészítmény, amelyben a b) tisztítókészítmény-anyagok legalább egy szövetlágyítót tartalmaznak.

11. Az 1. igénypont szerinti fehérítőkészítmény, amelyben az a) proteázenzim egy olyan szubtilizinváltozat, mely az alábbi helyettesítéskombinációk egyikét tartalmazza: 76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/ /104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/ /123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/ /101/103/104/123, 76/103/104/126, 76/103/104/135, 76/103/104/197, 76/103/104/222, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/126/265, 27/76/104/123/ /274, 27/76/104/109/123/274, 27/76/104/123/218/274, 27/76/104/123, 27/76/104/107/123, 27/76/104/109/ /123, 27/76/104/109/123/218/274, 27/76/104/123/197, 27/76/104/123/204, 27/76/104/123/206, 27/76/104/ /123/216, 27/76/104/123/218, 27/76/104/123/260, 27/76/104/123/195/197, 27/76/104/123/195/218, 27/76/104/123/197/218, 27/76/104/123/204/218, 27/76/104/123/206/218, 27/76/104/123/218/260, 27/76/104/123/195/197/218, 76/103/104/217, 76/103/ /104/156, 76/103/104/166, 76/103/104/105, 76/101/ /103/104, 76/103/104/128, 76/103/104/210, 76/103/ /104/107, 76/103/104/204, 76/217, 76/103/104/156/ /166 vagy 76/103/104/128.

12. Az 1. igénypont szerinti fehérítőkészítmény, amelyben az a) proteázenzim egy alábbi helyettesítéskombinációt tartalmazó szubtilizinváltozat: 76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123,

76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/ /103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/ /103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/128, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/197, 76/103/104/105, 76/103/104/135, 76/103/104/126, 76/103/104/107, 76/103/104/210, 76/103/104/126/265 és/vagy 76/103/104/222.

13. Szövettisztító készítmény, amely tartalmaz:

a) hatásos mennyiségű proteázenzimet, amely a természetben fel nem lelhető aminosavszekvenciával rendelkező karbonil-hidroláz-változat, amely egy szubtilizin prekurzor karbonil-hidrolázból származik, és amelyben a proteázenzim egy alábbi szubtilizinváltozat az N76D/S99D; N76D/S101R; N76D/S103A; N76D/ /V104I; N76D/I107V; N76D/N123S; N76D/S99D/ /S101R; N76D/S99D/S103A; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/ /S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/ /I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/ /V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/ /S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/ /V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/ /V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/ /S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/ /V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/ /S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/ /L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/ /V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N és N76D/S103A/V104I/M222A és ezek keverékeiből kiválasztva; és

b) 0,5–20 tömeg% fehérítőszert az alábbi csoportokból kiválasztva:

(i) (I) vagy (II) általános képletű szerves peroxisavak, amelyekben R^1 1–14 szénatomos alkil-, aril- vagy alkarilcsoport, R^2 1–14 szénatomos alkilén-, arilén- vagy alkariléncsoport és R^5 hidrogénatom vagy 1–10 szénatomos alkil-, aril- vagy alkarilcsoport, vagy

(ii) egy fehérítőaktivátor és egy, az aktivátorral reakcióba lépő, hidrogén-peroxid fejlesztésére képes peroxidvegyület kombinációja, amely *in situ* szerves peroxisavat képez a készítményből keletkező fehérítőoldatban, ahol a nevezett fehérítőaktivátor a (III) általános képletű, amelyben R 5–18 szénatomos alkilcsoport, ahol a leghosszabb lineáris alkillánc a karbonil szénatomtól terjedően és azt is beleértve körülbelül 6–10 szénatomot tartalmaz, és L olyan konjugálósav leválócsoportja, amely körülbelül 4–13 pKa értékkel rendelkezik; és

c) egy vagy több, a proteázenzimmel és fehérítőszerrel összeegyeztethető tisztítókészítmény-anyagot, beleértve legalább 5 tömeg% felületaktív anyagot és legalább 5 tömeg% mosószerépítőt a készítményre vonatkoztatva.

14. A 13. igénypont szerinti szövettisztító készítmény, amely c) tisztítókészítmény-anyagként tartalmaz továbbá oldószereket, puffereket, enzimeket, szennylazító ágenseket, agyagos talajt eltávolító ágenseket, diszpergálószereket, színélénkítőket, habzásgátlókat, szövetlágyítókat, habzást erősítőket, enzimstabilizátorokat, festékeket, parfümöket vagy ezek keverékeit.

15. A 13. igénypont szerinti szövettisztító készítmény, amely tartalmaz legalább egy enzimet a cellulázokat, lipázokat, amilázokat, proteázokat, peroxidázokat és ezek keverékeit tartalmazó csoportból kiválasztva.

16. A 13. igénypont szerinti szövettisztító készítmény folyadék, granulált vagy darabos formában.

17. A 13. igénypont szerinti szövettisztító készítmény, amelyben a proteázenzim egy szubtilizinváltozat az N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/ /V104Y/I107V, N76D/S101R/S103A/V104I, N76D/ /S99D/S101R/S103A/V104I, N76D/S101R/V104I és ezek keverékeiből kiválasztva.

18. A 13. igénypont szerinti szövettisztító készítmény, amelyben a proteázenzim egy *Bacillus* szubtilizinváltozat az N76D/V104I, N76D/S103A/V104I és ezek keverékeiből kiválasztva.

19. A 13. igénypont szerinti szövettisztító készítmény, amely olyan fehérítőszert tartalmaz, amely legalább 0,1%-ban vizes folyadékban hidrogén-peroxid fejlesztésére képes peroxid fehérítővegyületet és legalább 0,1%-ban egy vagy több fehérítőaktivátort tartalmaz, ahol a nevezett fehérítőaktivátorokat a következő csoportokból választjuk ki:

(i) (IV) vagy (V) általános képletű fehérítőaktivátorok vagy ezek keverékei, ahol R^1 1–14 szénatomos alkil-, aril- vagy alkarilcsoport, R^2 1–14 szénatomos alkilén-, arilén- vagy alkariléncsoport, R^5 hidrogénatom vagy 1–10 szénatomos alkil-, aril- vagy alkarilcsoport és L egy leválócsoport;

(ii) (XV) általános képletű benzoxazin típusú fehérítőaktivátor, ahol R^1 H, alkil-, alkaril-, aril-, aril-alkilcsoport, és amelyben R^2, R^3, R^4 és R^5 azonos vagy különböző lehet és jelentése H, haloid, alkil-, alkenil-, aril-, hidroxil-, alkoxil-, amino-, alkil-amino-csoport, $-COOR^6$ (ahol R^6 hidrogénatom vagy alkilcsoport) vagy karbonil funkciós csoport;

(iii) (XIII) általános képletű N-acil-kaprolaktám fehérítőaktivátor, ahol R^6 hidrogénatom vagy 1–12 szénatomos alkil-, aril-, alkoxi-aril- vagy alkarilcsoport; és

(iv) az (i)–(iii) keverékei.

20. A 13. igénypont szerinti szövettisztító készítmény, amelyben a szerves peroxisav fehérítőszernek megfelelő karbonsav 3–6,5 hidrofil-lipofil egyensúlyi értékkel (HLB-vel) rendelkezik.

21. A 20. igénypont szerinti szövettisztító készítmény, amelyben a készítmény 100 g-jára vonatkoztatott mg proteázenzim és a szerves peroxisavból ppm-ben megadott elméletileg felhasználható oxigén (AvO_2) aránya 1:1 és 20:1 közé esik.

22. Szövettisztító készítmény, amely tartalmaz:

a) 0,0001–10 tömeg% proteázenzimet, amely *Bacillus lentus* szubtilizinből származó N76D/S103A/V104I szubtilizinváltozat;

b) 0,5–20 tömeg% fehérítőrendszert, amely legalább 0,1 tömeg%-ban vizes folyadékban hidrogén-peroxid fejlesztésére képes peroxid fehérítővegyületet és legalább 0,1 tömeg%-ban egy vagy több fehérítőaktivátort tartalmaz, ahol a nevezett fehérítőaktivátorokat a következő csoportokból választjuk ki:

(i) (IV) és (V) általános képletű fehérítőaktivátorok vagy ezek keverékei, ahol R^1 1–14 szénatomos alkil-, aril- vagy alkarilcsoport, R^2 1–14 szénatomos alkilén-, arilén- vagy alkariléncsoport, R^5 hidrogénatom vagy 1–10 szénatomos alkil-, aril- vagy alkarilcsoport és L egy leválócsoport;

(ii) (XV) általános képletű benzoxazin típusú fehérítőaktivátor, ahol R^1 H, alkil-, alkaril-, aril-, aril-alkilcsoport, és amelyben R^2, R^3, R^4 és R^5 azonos vagy különböző lehet és jelentésük H, haloid, alkil-, alkenil-, aril-, hidroxil-, alkoxil-, amino-, alkil-amino-csoport, $-COOR^6$ (ahol R^6 hidrogénatom vagy alkilcsoport) vagy karbonil funkciós csoport;

(iii) (XIII) általános képletű N-acil-kaprolaktám fehérítőaktivátor, ahol R^6 hidrogénatom vagy 1–12 szénatomos alkil-, aril-, alkoxi-aril- vagy alkarilcsoport; és

(iv) (i)–(iii) keveréke;

c) legalább 5 tömeg% felületaktív anyagot;

d) legalább 5 tömeg% mosószerépítőt; és

e) adott esetben egy vagy több, a proteázenzimmel és fehérítőrendszerrel összeegyeztethető tisztítókészítmény-anyagot, oldószereket, puffereket, enzimeket, szennylazító ágenseket, agyagos talajt eltávolító ágenseket, diszpergálószereket, színélénkítőket, habzásgátlókat, szövetlágyítókat, habzást erősítőket, enzimstabilizátorokat, mosószerépítőket, festékeket, parfümöket és ezek keverékeit tartalmazó csoportból kiválasztva.

23. A 22. igénypont szerinti szövettisztító készítmény, amely felületaktív anyagként alkil-benzolszulfonátokat, primer alkil-szulfátokat, szekunder alkil-szulfátokat, alkil-alkoxi-szulfátokat, alkil-alkoxi-karboxilátokat, alkil-poliglikozidokat és azoknak megfelelő szulfatált poliglikozidokat, alfa-szulfonált-zsírsav-észtereket, alkil- és alkil-fenol-alkoxilátokat, betainokat és szulfobetainokat, amin-oxidokat, N-metil-glükamidokat, nemionos primer etoxilált alkoholokat, nemionos primer, kevert etoxi/propoxi alkoholokat vagy ezek keverékeit; mosószerépítőként zeolitokat, polikarboxilátokat, rétegelt szilikátokat, foszfátokat vagy ezek keverékeit tartalmazza.

24. A 23. igénypont szerinti készítmény, amely továbbá a tisztítókészítmény legalább 0,001 tömeg%-ában egy enzimet tartalmaz proteázok, amilázok, lipázok, cellulázok, peroxidázok és ezek keverékei közül.

25. A 22. igénypont szerinti készítmény, amelyben a nevezett fehérítőaktivátort benzoil-kaprolaktámot, nonanoil-kaprolaktámot és [6-(nonán-amido)-kaproil-oxi]-benzolszulfonátot és ezek keverékeit tartalmazó csoportból választjuk ki.

26. A 22. igénypont szerinti készítmény, amelyben a peroxid fehérítővegyületet nátrium-perborát-monohidrátot, nátrium-perborát-tetrahidrátot, nátrium-pirofoszfát-peroxi-hidrátot, karbamid-peroxi-hidrátot, nátrium-perkarbonátot, nátrium-peroxidot és ezek keverékeit tartalmazó csoportból választjuk ki.

27. A 26. igénypont szerinti készítmény, amelyben a hidrogén-peroxidnak a fehérítőaktivátorhoz viszonyított moláris aránya nagyobb mint 1,0.

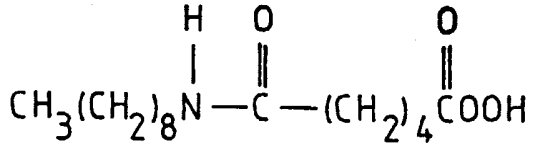
28. A 22. igénypont szerinti készítmény, amelyben R^1 6–12 szénatomos alkilcsoport, R^2 1–8 szénatomot tartalmaz és R^5 hidrogénatom vagy metilcsoport.

29. A 22. igénypont szerinti készítmény, amelyben R^1 7–10 szénatomos alkilcsoport, R^2 4–5 szénatomot tartalmaz és L (a), (b) vagy (c) általános képletű csoport, ahol R^3 1–8 szénatomos alkillánc és Y $-SO_3^-M^+$ vagy $-COO^-M^+$, ahol M nátrium vagy kálium.

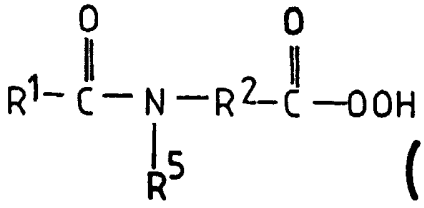
30. A 22. igénypont szerinti készítmény, amely N-acil-kaprolaktámot tartalmaz a benzoil-kaprolaktámot, oktanoil-kaprolaktámot, nonanoil-kaprolaktámot, 3,5,5-trimetil-hexanoil-kaprolaktámot, dekanoil-kaprolaktámot, undekanoil-kaprolaktámot és ezek keverékeit tartalmazó csoportból kiválasztva.

31. Eljárás szövet tisztítására, *azzal jellemezve,* hogy a tisztítandó szövetet egy 1. igénypont szerinti készítmény hatásos mennyiségét tartalmazó mosóoldattal érintkezésbe hozzuk.

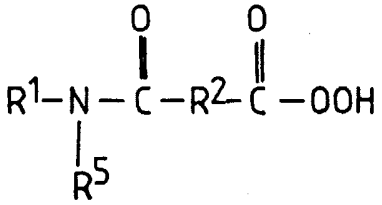
32. Eljárás szövet tisztítására, *azzal jellemezve,* hogy a tisztítandó szövetet egy 22. igénypont szerinti készítmény hatásos mennyiségét tartalmazó mosóoldattal érintkezésbe hozzuk.



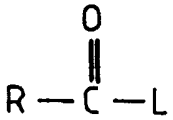
(A)



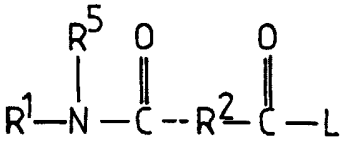
(I)



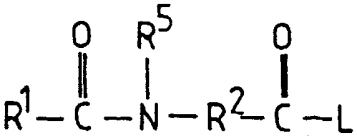
(II)



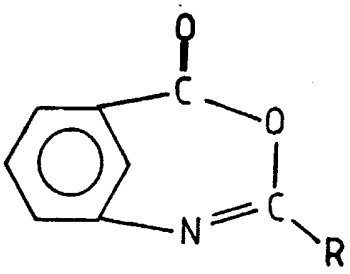
(III)



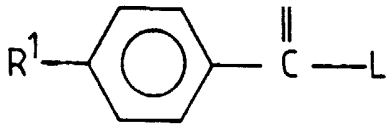
(IV)



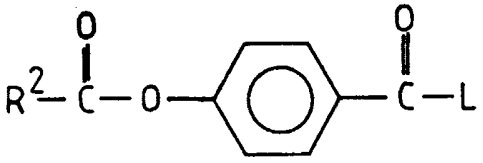
(V)



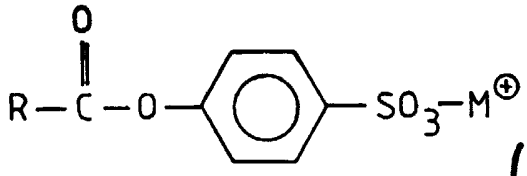
(VI)



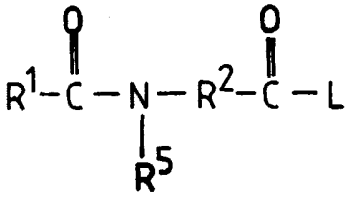
(VII)



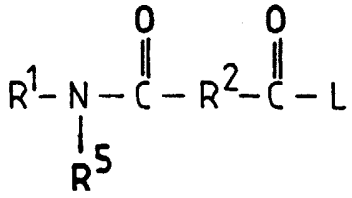
(VIII)



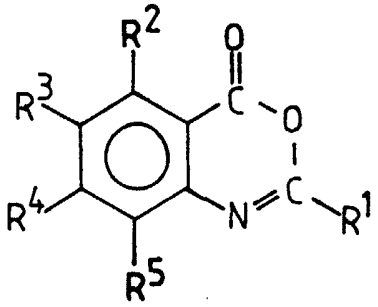
(IX)



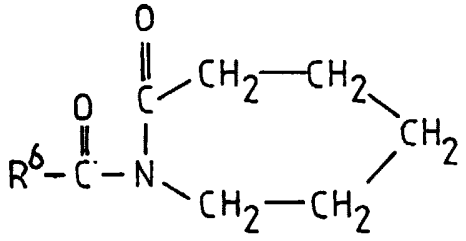
(X)



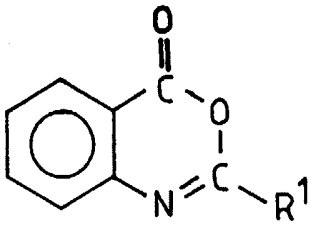
(XI)



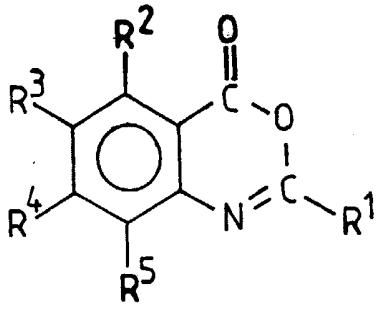
(XII)



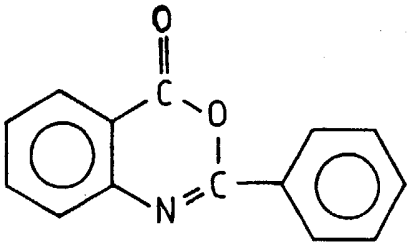
(XIII)



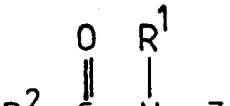
(XIV)



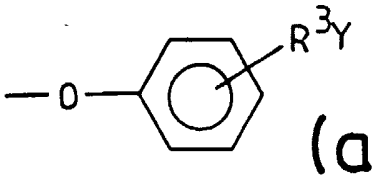
(XV)



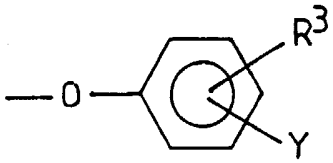
(XVI)



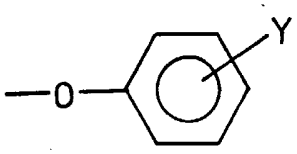
(XVII)



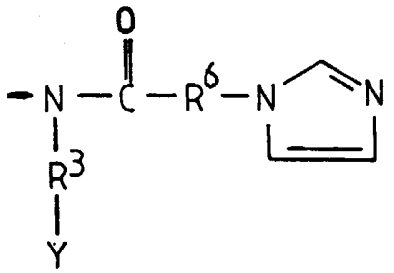
(a)



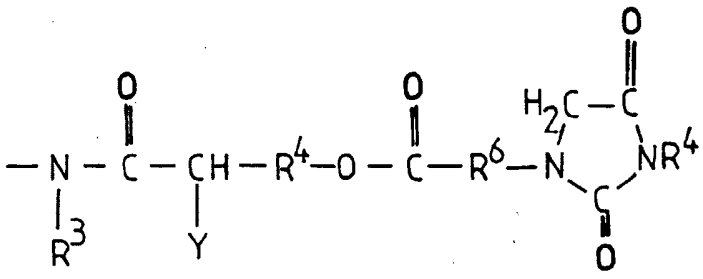
(b)



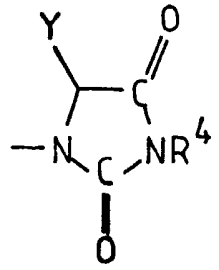
(c)



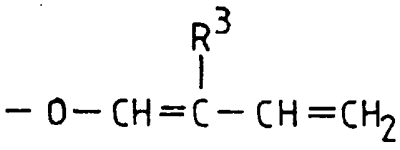
(d)



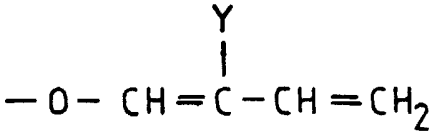
(e)



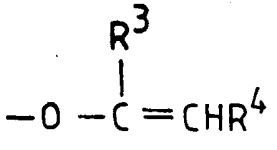
(f)



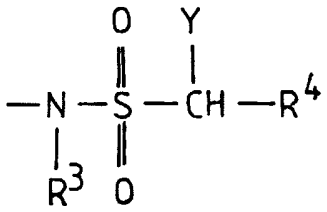
(g)



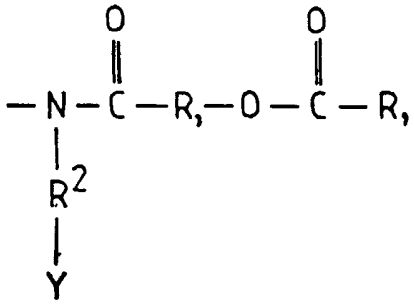
(h)



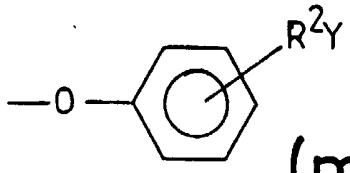
(j)



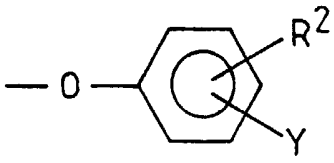
(k)



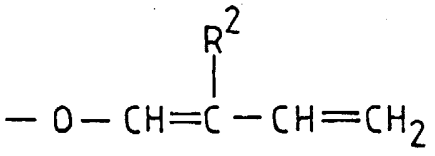
(l)



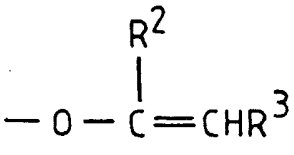
(m)



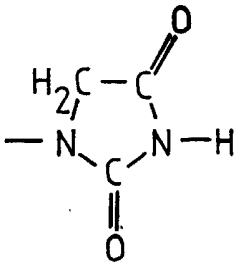
(n)



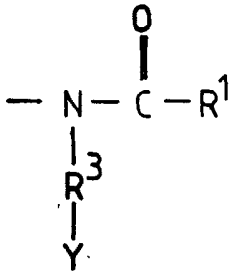
(o)



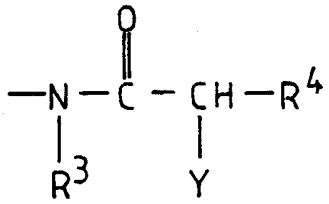
(p)



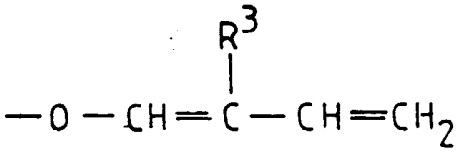
(q)



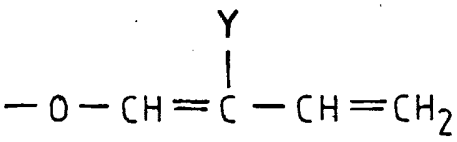
(t)



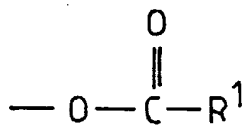
(u)



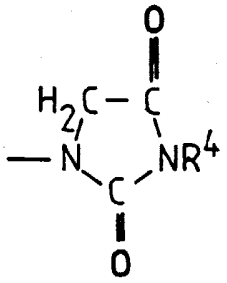
(v)



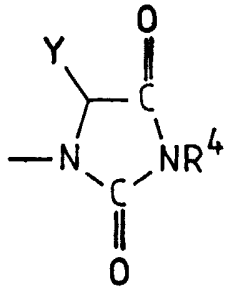
(w)



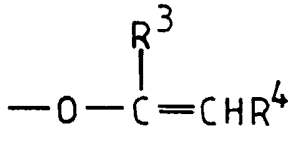
(x)



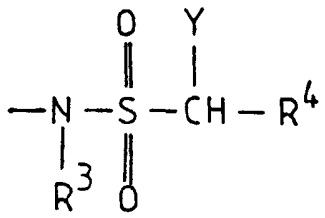
(y)



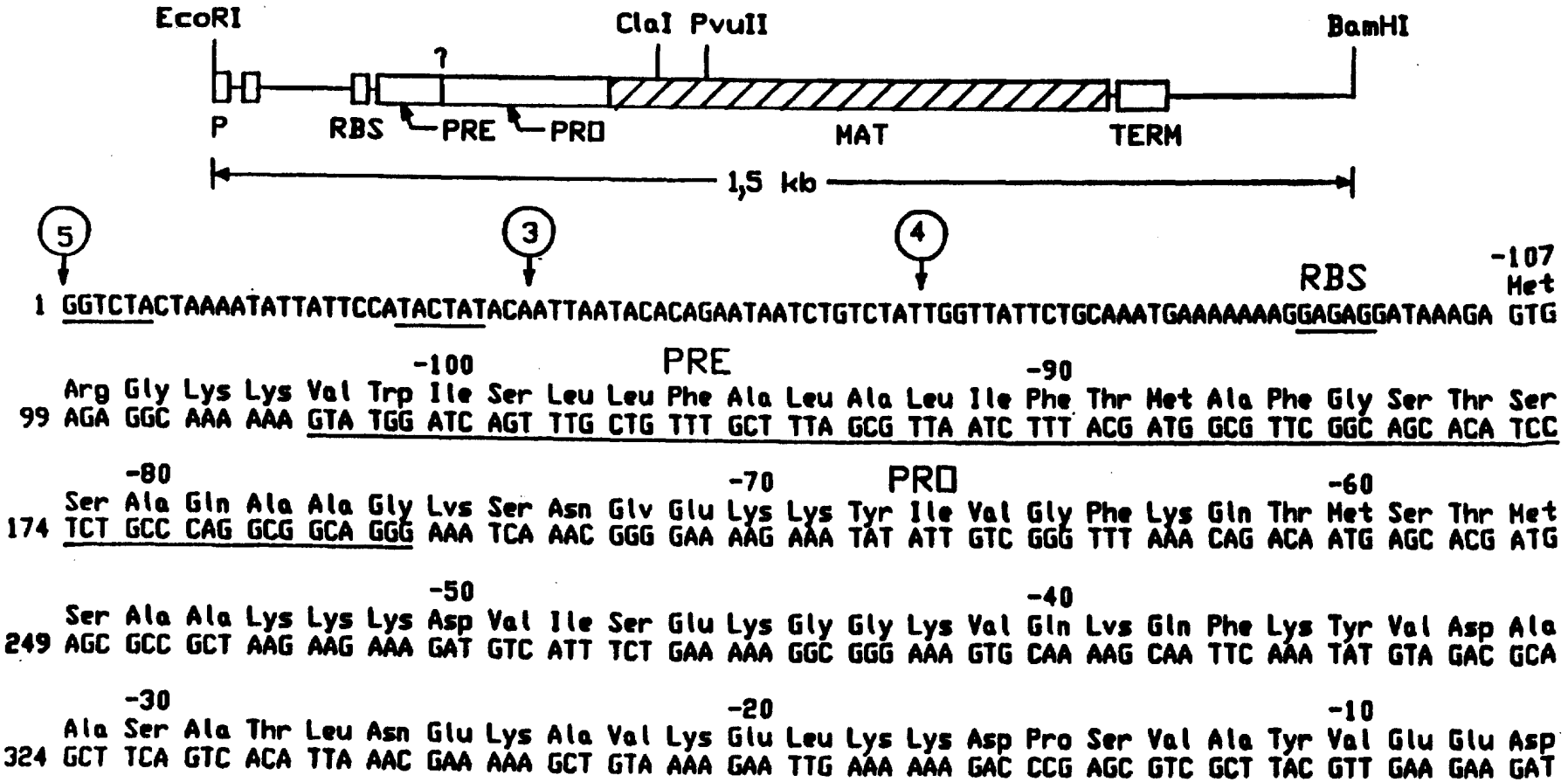
(z)



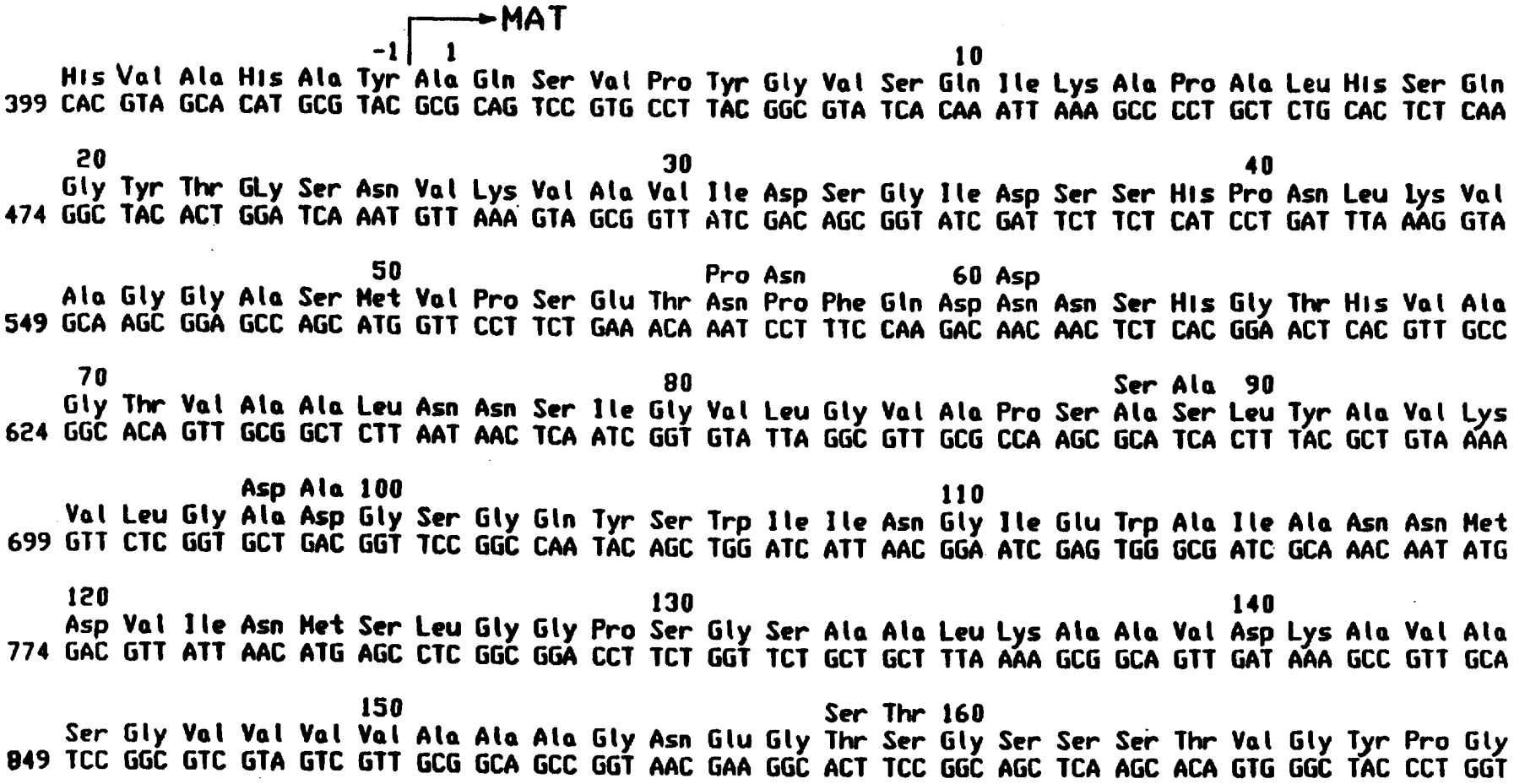
(aa)



(ab)


EcoRI
ClaI PvuII
BamHI
?
P
RBS
PRE
PRO
MAT
TERM
1,5 kb
5
3
4
RBS
-107
Met
1 GGTCTACTAAAATATTATTCCATACTATACAATTAATACACAGAATAATCTGTCTATTGGTTATTCTGCAAATGAAAAAAAGGAGAGGATAAAGA GTG
-100
PRE
-90
Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser
99 AGA GGC AAA AAA GTA TGG ATC AGT TTG CTG TTT GCT TTA GCG TTA ATC TTT ACG ATG GCG TTC GGC AGC ACA TCC
-80
-70
PRO
-60
Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys Ser Asn Glu Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser Thr Met
174 TCT GCC CAG GCG GCA GGG AAA TCA AAC GGG GAA AAG AAA TAT ATT GTC GGG TTT AAA CAG ACA ATG AGC ACG ATG
-50
-40
Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala
249 AGC GCC GCT AAG AAG AAA GAT GTC ATT TCT GAA AAA GGC GGG AAA GTG CAA AAG CAA TTC AAA TAT GTA GAC GCA
-30
-20
-10
Ala Ser Ala Thr Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr Val Glu Glu Asp
324 GCT TCA GTC ACA TTA AAC GAA AAA GCT GTA AAA GAA TTG AAA AAA GAC CCG AGC GTC GCT TAC GTT GAA GAA GAT

1A. ábra


MAT
-1 1 10
His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln
399 CAC GTA GCA CAT GCG TAC GCG CAG TCC GTG CCT TAC GGC GTA TCA CAA ATT AAA GCC CCT GCT CTG CAC TCT CAA
20 30 40
Gly Tyr Thr GLy Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asn Leu Lys Val
474 GGC TAC ACT GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT GAT TTA AAG GTA
50 Pro Asn 60 Asp
Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala
549 GCA AGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC
70 80 Ser Ala 90
Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys
624 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC GCT GTA AAA
Asp Ala 100 110
Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
699 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG
120 130 140
Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
774 GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA
150 Ser Thr 160
Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly
849 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT

1B. ábra

```
    170                                         180                                         190
    Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arp Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro
924 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

                        200                                         210
    Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Glv Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
999 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT

    220                                         230                                         240
    Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Aal Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

                        250 Gln                                     260
    Gln Val Aro Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn
1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TTG TAC TAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC

    270                 275
    Val Gln Ala Ala Ala Gln DC                      TERM
1224 GTA CAA GCG GCA GCT CAG TAA  AACATAAAAAACCGGCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTTATTATTTTTCTTCCTCCGCATGTTCAATCCGCTCC

1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAACTCCTGAAACGTCTCAATCGCCG

1416 CTTCCCGGTTTCCGGTCAGCTCAATGCCATAACGGTCGGCGGCGTTTTCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC
```

1C. ábra

KONZERVATÍV MARADÉKOK *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*-BŐL SZÁRMAZÓ SZUBTILIZINEKBEN

1										10										20
A	Q	S	V	P	.	G	.	.	.	.	.	A	P	A	.	H	.	.	G	
21										30										40
.	T	G	S	.	V	K	V	A	V	.	D	.	G	.	.	.	.	H	P	
41										50										60
D	L	.	.	.	G	G	A	S	.	V	P	.	.	.	.	.	.	Q	D	
61										70										80
.	N	.	H	G	T	H	V	A	G	T	.	A	A	L	N	N	S	I	G	
81										90										100
V	L	G	V	A	P	S	A	.	L	Y	A	V	K	V	L	G	A	.	G	
101										110										120
S	G	.	.	S	.	L	.	.	G	.	E	W	A	.	N	.	.	.	.	
121										130										140
V	.	N	.	S	L	G	.	P	S	.	S	.	.	.	.	.	A	.	.	
141										150										160
.	.	.	.	.	.	G	V	.	V	V	A	A	.	G	N	.	G	.	.	
161										170										180
.	.	.	.	.	.	.	Y	P	.	.	Y	.	.	.	.	A	V	G	A	.
181										190										200
D	.	.	N	.	.	A	S	F	S	.	.	G	.	.	L	D	.	.	A	
201										210										220
P	G	V	.	.	Q	S	T	.	P	G	.	.	Y	.	.	.	N	G	T	
221										230										240
S	M	A	.	P	H	V	A	G	A	A	A	L	.	.	.	K	.	.	.	
241										250										260
W	.	.	.	Q	.	R	.	.	L	.	N	T	.	.	.	L	G	.	.	
261										270										
.	.	Y	G	.	G	L	.	N	.	.	A	A	.	.						

2. ábra

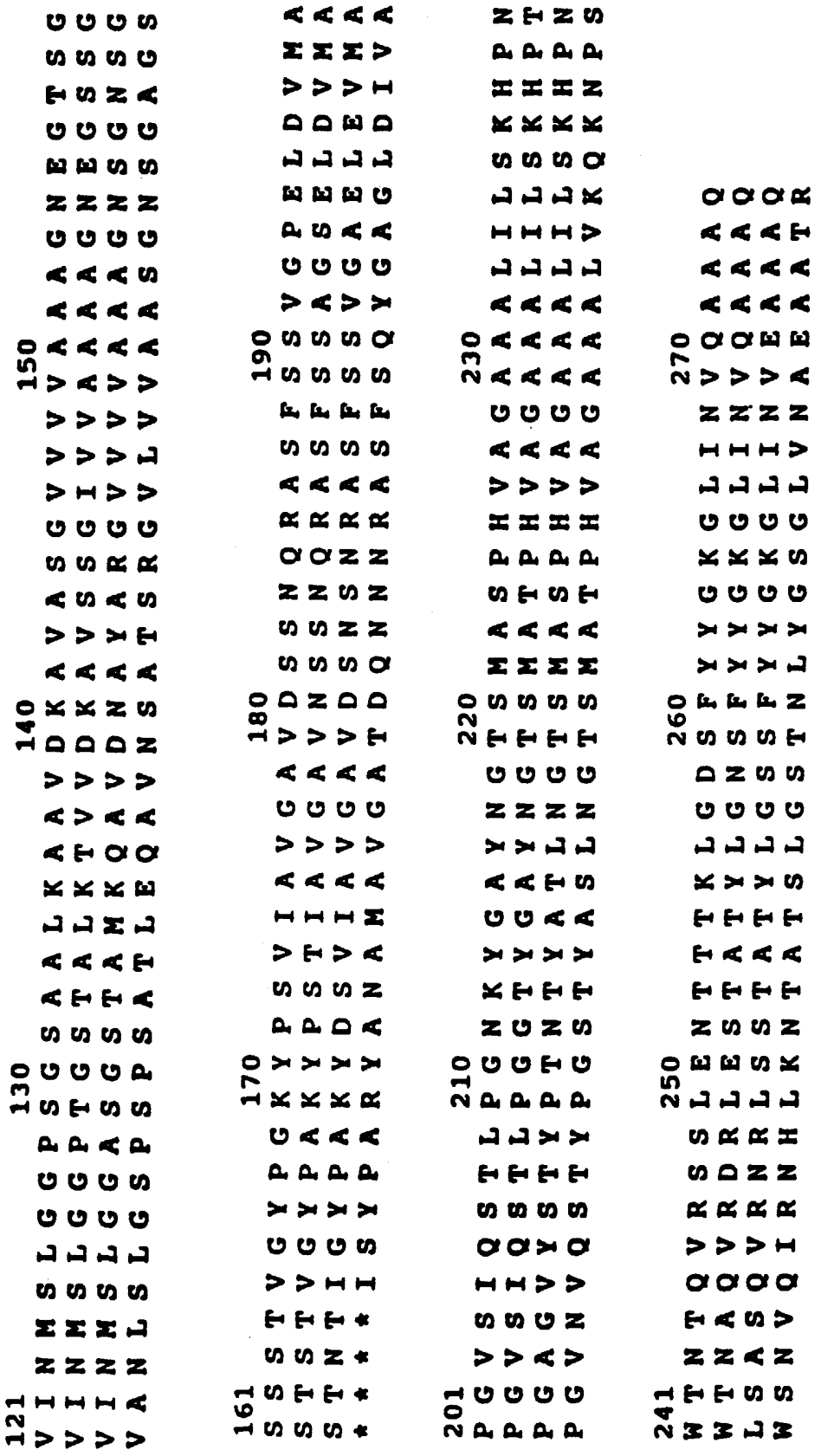
B.amyloliquefaciens-ből,
B.subtilis-ből,
B.licheniformis-ból és
B. lentus-ból
származó szubtilizin szekvenciák összehasonlítása:

```
01                  10                  20                  30
A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P
A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P

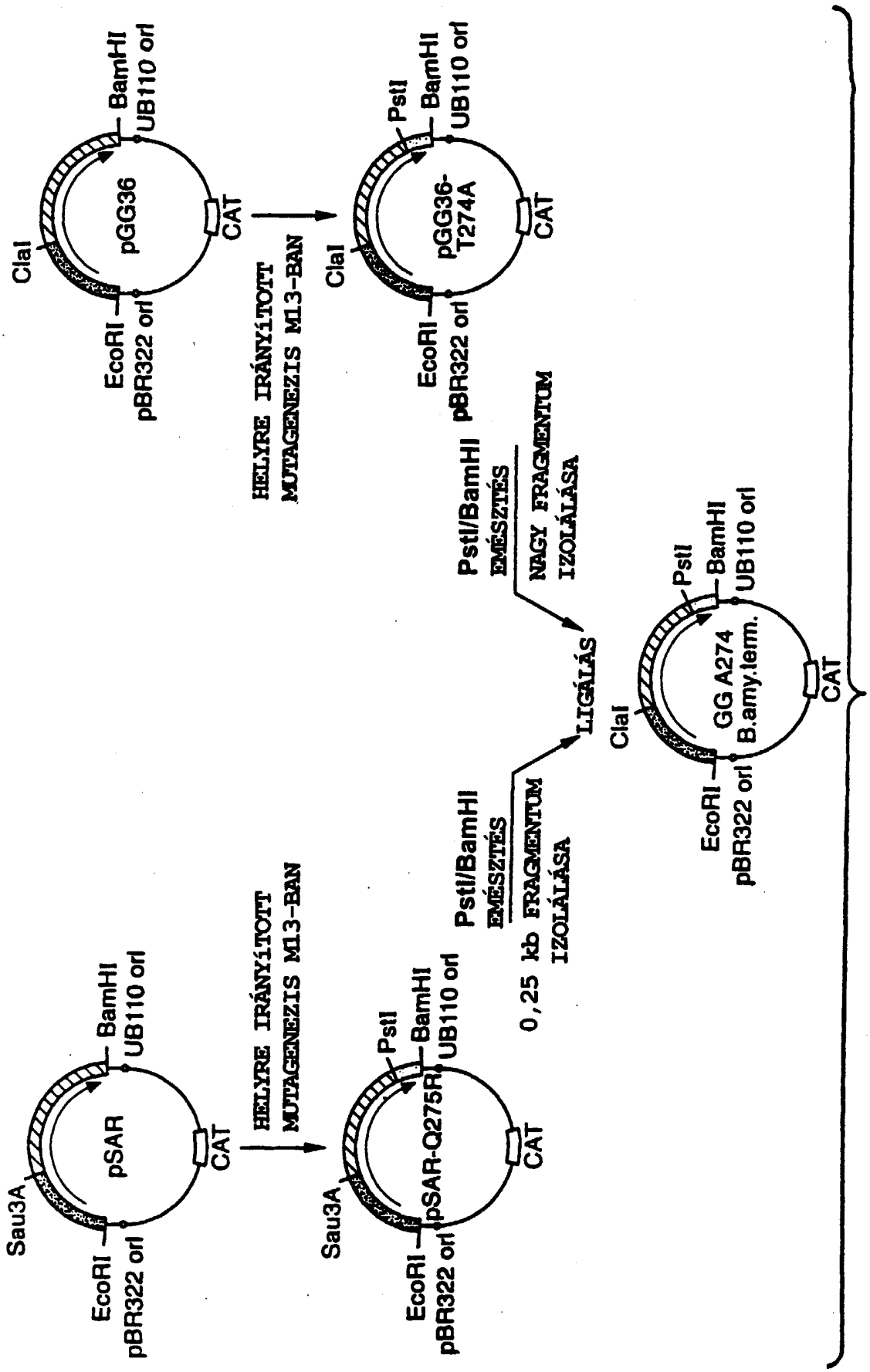
41                  50                  60                  70
D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G
D L N V R G G A S F V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
D L N V V G G A S F V A G E A Y N * T D G N G H G T H V A G T V A A L D N T T G
D L N I R G G A S F V P G E * P S T Q D G N G H G T H V A G T I A A L N N S I G

81                  90                  100                 110
V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D
V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D
V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D
V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H
```

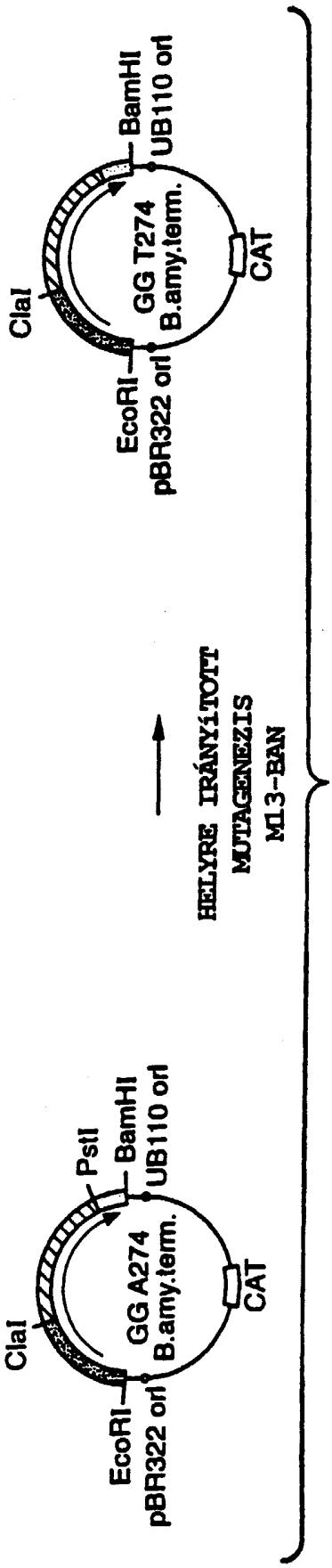
3A. ábra


121
VINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGGVVVVAAAAGNEGTSG
VIINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVVAAAAGNEGSSG
VINMSLGGASGSTAMKQAVDNAYARGVVVVAAAAGNSGAGS
VANLSLGSPSSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGS
130
140
150
161
SSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMA
SSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASSFSAGSELDVMA
STNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSSNNRASFSSVGGAELEVMA
**ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVA
170
180
190
201
PGVSIQSSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILLSKHPN
PGVSVYSSTYPTNTYASLNGTSMATPHVAGAAALILLSKHPT
PGAGVYSSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILLSKHPN
PGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAALVKQKNPS
210
220
230
241
WTNTQVRSSLENTTTKLGDSFYYYGKGLINVVQAAAAQ
WTNAQVRDRLESSTATYLGNSFYYYGKGLINVVQAAAAQ
LSASQVRNRLSSTATYLGGSSFYYYGKGLINVVEAAAAQ
WSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR
250
260
270

3B. ábra


ClaI
BamHI
UB110 ori
pGG36
CAT
EcoRI
pBR322 ori
HELYRE IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZIS M13-BAN
PstI
pGG36-T274A
PstI/BamHI EMÉSZTÉS
NAGY FRAGMENTUM IZOLÁLÁSA
LIGÁLÁS
Sau3A
pSAR
HELYRE IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZIS M13-BAN
pSAR-Q275R
0,25 kb FRAGMENTUM IZOLÁLÁSA
GG A274 B.amy.lerm.

4. ábra


ClaI
EcoRI
pBR322 ori
GG A274
B.amy.term.
PstI
BamHI
UB110 ori
CAT
HELYRE IRÁNYÍTOTT
MUTAGENEZIS
M13-BAN
ClaI
EcoRI
pBR322 ori
GG T274
B.amy.term.
BamHI
UB110 ori
CAT

5. ábra

```
        10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

        70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

       130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

       190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

       250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

       310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

       370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla

       430                 450                 470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

       490                 510                 530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

       550                 570                 590
ATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

       610                 630                 650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu

       670                 690                 710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

       730                 750                 770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla
```

6A. ábra

```
       790                   810                   830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

       850                   870                   890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

       910                   930                   950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

       970                   990                  1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

      1030                  1050                  1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

      1090                  1110                  1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
```

6B. ábra

```
        10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

        70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

        130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

        190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

        250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

        310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

        370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla

        430                 450                 470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

        490                 510                 530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

        550                 570                 590
ATTGCTGCTTTAGACAACTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

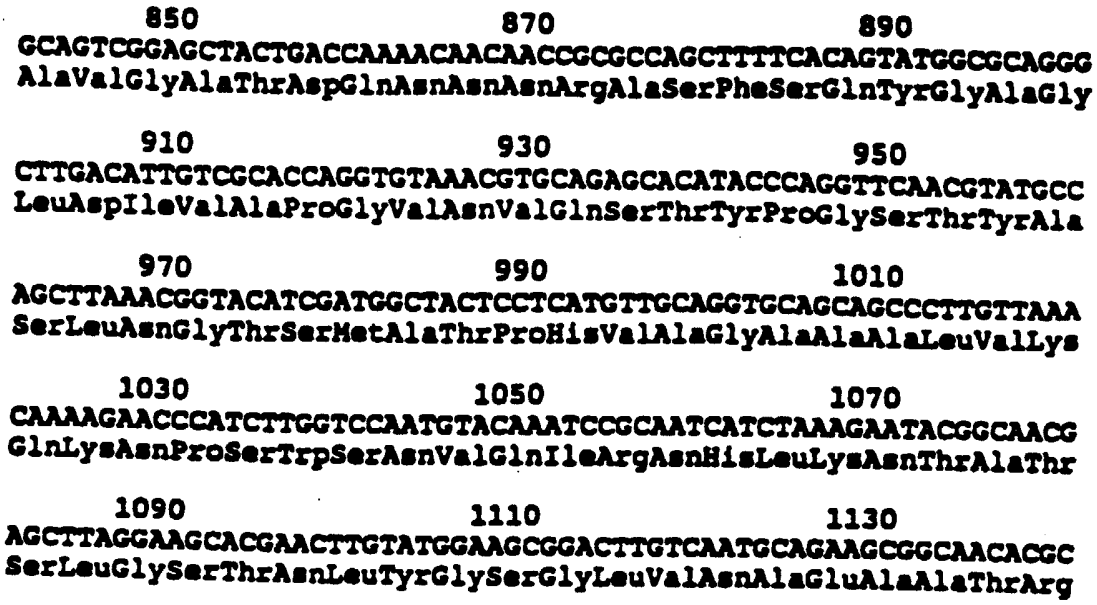
        610                 630                 650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

        670                 690                 710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

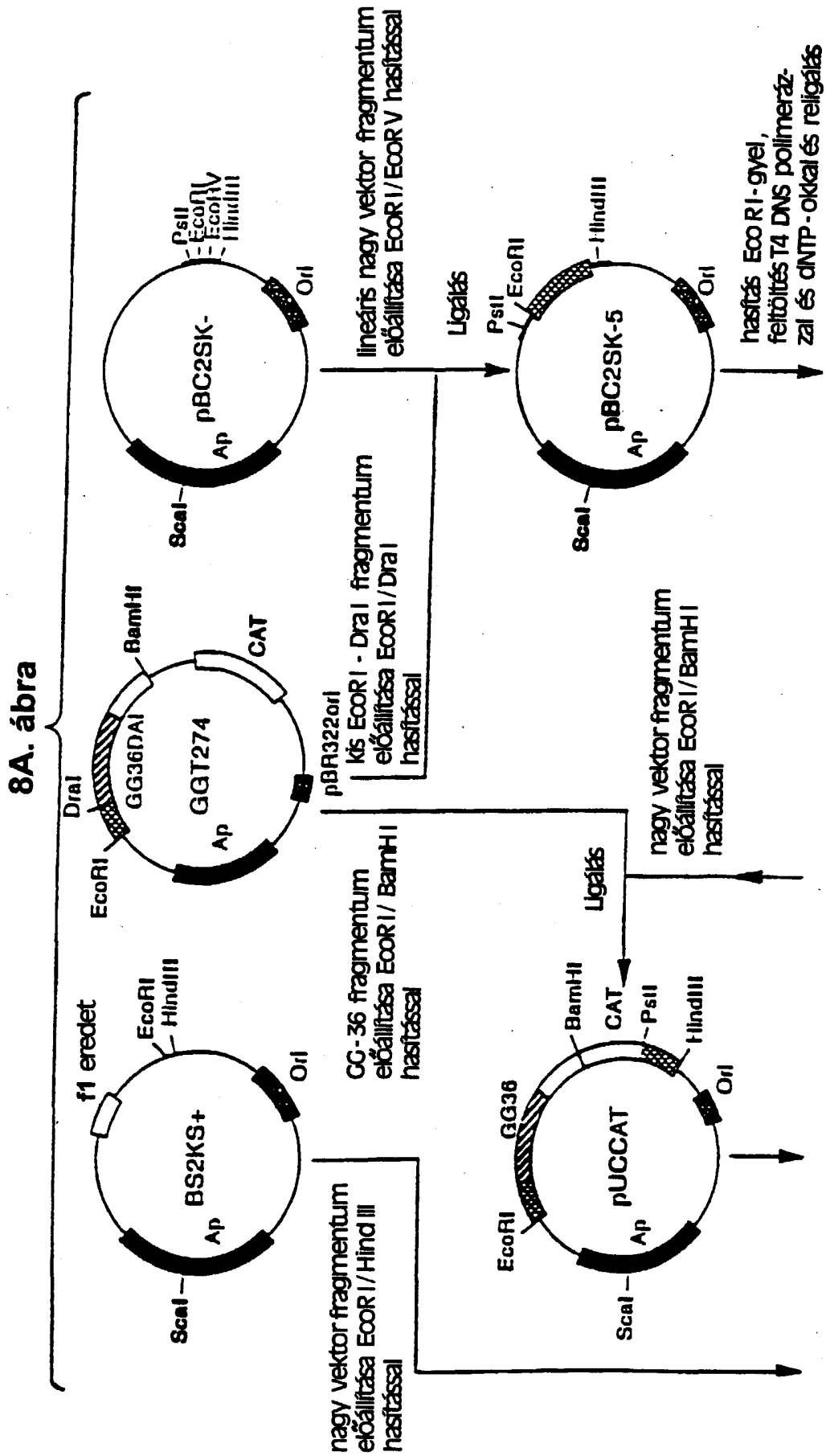
        730                 750                 770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

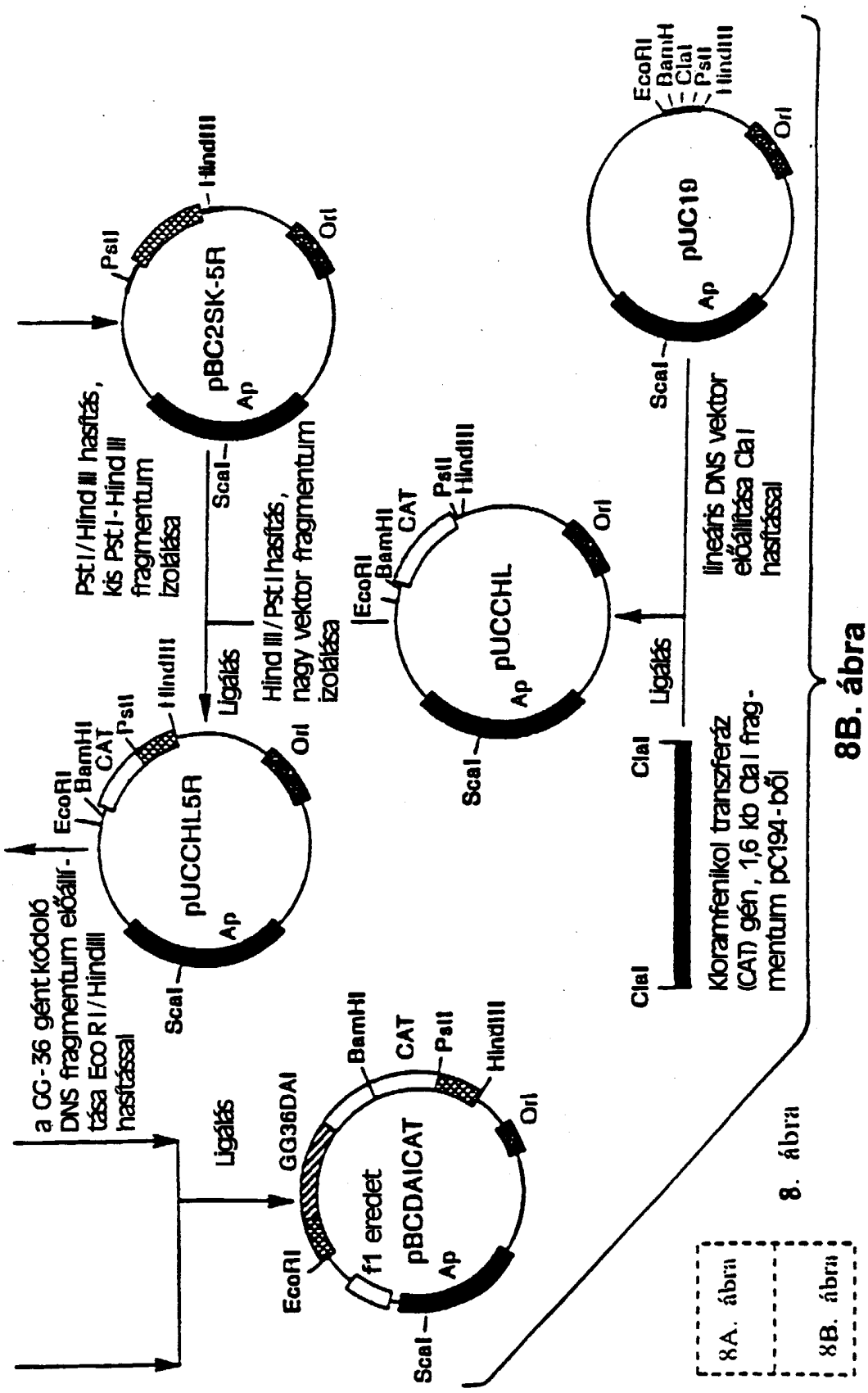
        790                 810                 830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
```

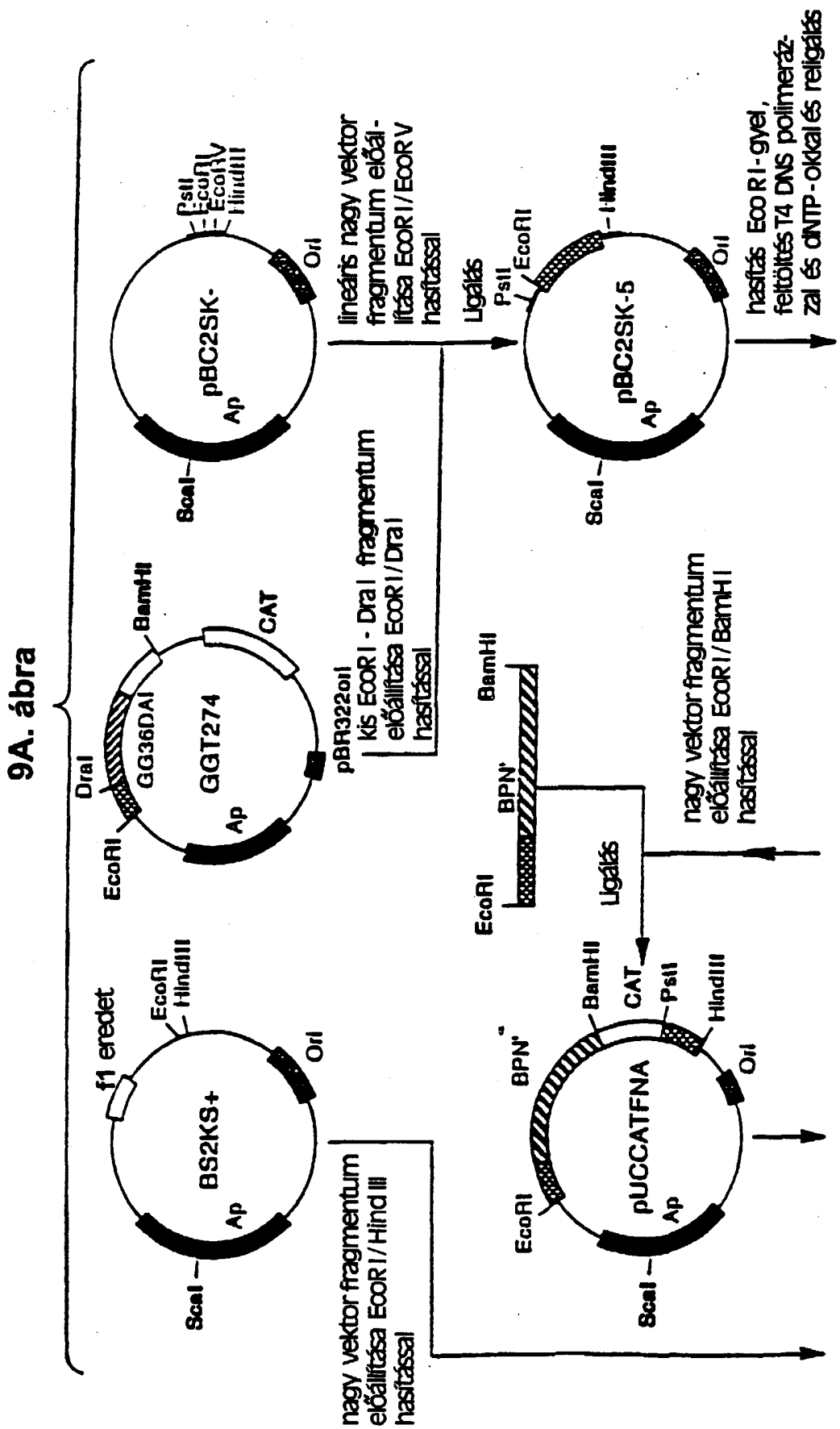
7A. ábra

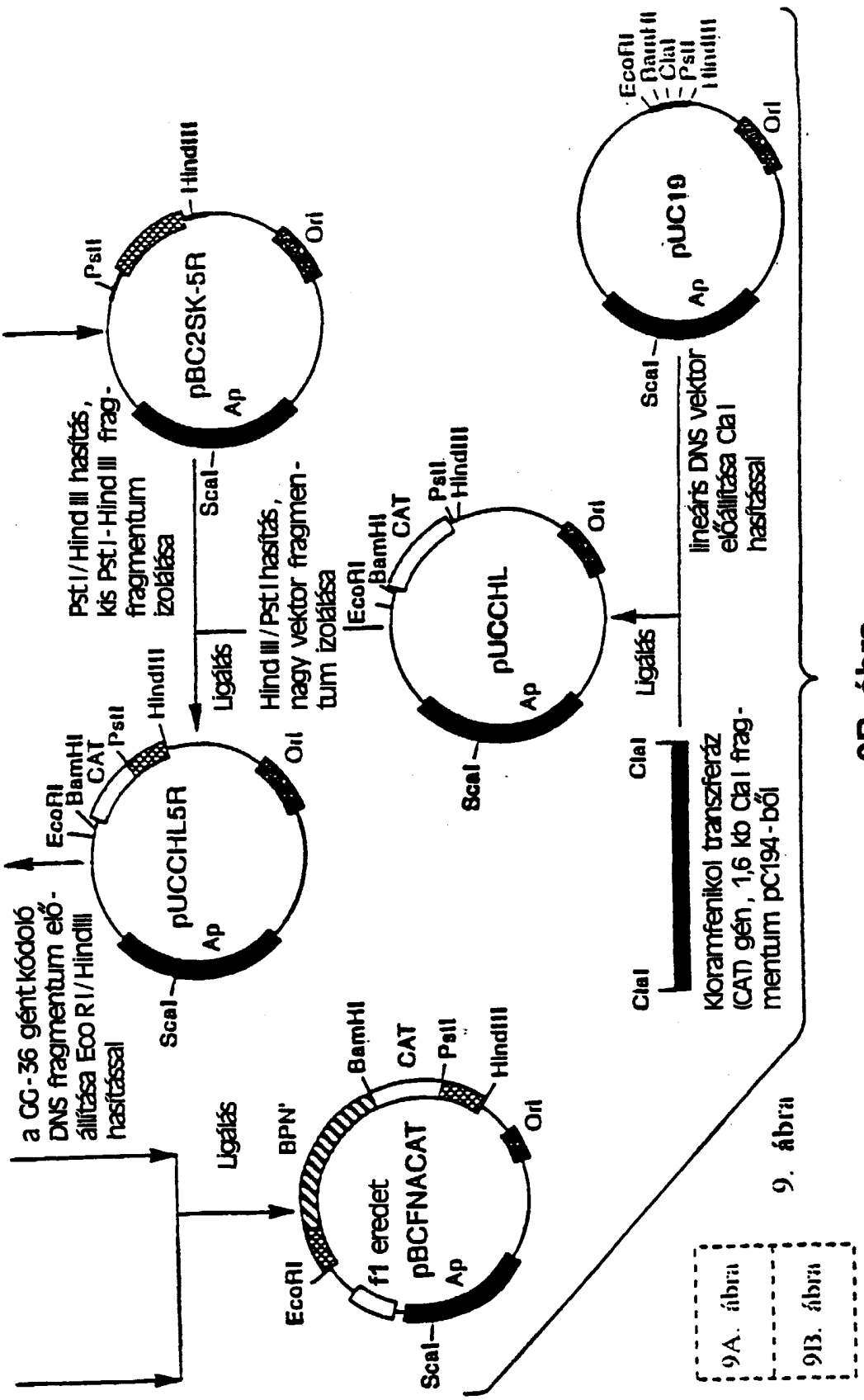

850 870 890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly
910 930 950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla
970 990 1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys
1030 1050 1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr
1090 1110 1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg

7B. ábra


8A. ábra
f1 eredet
EcoRI
HindIII
BS2KS+
Ap
ScaI
Ori
nagy vektor fragmentum előállítása EcoRI/Hind III hasítással
DraI
EcoRI
GG36DAI
BamHI
GGT274
CAT
Ap
pBR322ori
kis EcoRI - DraI fragmentum előállítása EcoRI/DraI hasítással
CG-36 fragmentum előállítása EcoRI/ BamHI hasítással
PsiI
EcoRI
EcoRV
HindIII
pBC2SK-
Ap
ScaI
Ori
lineáris nagy vektor fragmentum előállítása EcoRI/EcoRV hasítással
Ligálás
nagy vektor fragmentum előállítása EcoRI/BamHI hasítással
Ligálás
BamHI
CAT
PsiI
HindIII
GG36
EcoRI
pUCCAT
Ap
ScaI
Ori
PsiI
EcoRI
HindIII
pBC2SK-5
Ap
ScaI
Ori
hasítás EcoRI-gyel, feltöltés T4 DNS polimeráz-zal és dNTP-okkal és religálás


a GG-36 gént kódoló DNS fragmentum előállítása EcoRI/HindIII hasítással
Ligálás
GG36DAI
EcoRI
f1 eredet
BamHI
CAT
PstI
HindIII
Ori
Ap
ScaI
pBCDAICAT
pUCCHL5R
pBC2SK-5R
pUCCHL
pUC19
Pst I/Hind III hasítás, kis Pst I-Hind III fragmentum izolálása
Hind III/Pst I hasítás, nagy vektor fragmentum izolálása
lineáris DNS vektor előállítása ClaI hasítással
ClaI
Kloramfenikol transzferáz (CAT) gén, 1,6 kb ClaI fragmentum pC194-ből
8B. ábra
8. ábra
8A. ábra
8B. ábra


9A. ábra
f1 eredet
EcoRI
HindIII
BS2KS+
Ori
Ap
ScaI
nagy vektor fragmentum előállítása EcoRI/HindIII hasítással
DraI
EcoRI
GG36DAI
BamHI
GGT274
CAT
Ap
pBR322ori
kis EcoRI - DraI fragmentum előállítása EcoRI/DraI hasítással
PstI
EcoRI
EcoRV
HindIII
pBC2SK-
Ap
Ori
ScaI
lineáris nagy vektor fragmentum előállítása EcoRI/EcoRV hasítással
Ligálás
PstI
EcoRI
HindIII
pBC2SK-5
Ap
Ori
ScaI
hasítás EcoRI-gyel, feltöltés T4 DNS polimerázzal és dNTP-okkal és religálás
EcoRI
BPN'
BamHI
nagy vektor fragmentum előállítása EcoRI/BamHI hasítással
Ligálás
BPN'
BamHI
CAT
PstI
HindIII
pUCCATFNA
Ap
Ori
EcoRI
ScaI


a GG-36 gént kódoló DNS fragmentum előállítása Eco RI/HindIII hasítással
Ligálás
pBCFNACAT
f1 eredet
BPN'
BamHI
CAT
PstI
HindIII
EcoRI
ScaI
Ap
Ori
pUCCHL5R
EcoRI
BamHI
CAT
PstI
HindIII
ScaI
Ap
Ori
Ligálás
PstI/HindIII hasítás, kis PstI-HindIII fragmentum izolálása
pBC2SK-5R
PstI
HindIII
ScaI
Ap
Ori
HindIII/PstI hasítás, nagy vektor fragmentum izolálása
pUCCHL
EcoRI
BamHI
CAT
PstI
HindIII
ScaI
Ap
Ori
Ligálás
lineáris DNS vektor előállítása ClaI hasítással
pUC19
EcoRI
BamHI
ClaI
PstI
HindIII
ScaI
Ap
Ori
ClaI
ClaI
Kloramfenikol transzferáz (CAT) gén, 1,6 kb ClaI fragmentum pC194-ből
9B. ábra
9. ábra
9A. ábra
9B. ábra