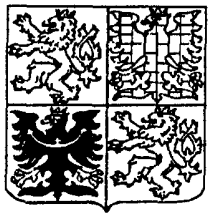
ČESKÁ REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 13.10.94

(32) 14.10.93, 02.05.94

(31) 93/136626, 94/237938

(33) US, US

(40) 11.09.96

(21) 1052-96

(13) A3

6(51)

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

(71) THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, Cincinnati, OH, US;

(72) Burns Michael Eugene, West Chester, OH, US;
Ghosh Chanchal Kumar, West Chester, OH, US;
Digiulio David Neil, Cincinnati, OH, US;
Getty Edward Eugene, Cincinnati, OH, US;
Willey Alan David, Cincinnati, OH, US;
Hartshorn Richard Timothy, Newcastle Upon the Tyne, GB;
Brode Philip Frederick III, Cincinnati, OH, US;
Barnett Bobby Lee, Cincinnati, OH, US;
Rubingh Donn Nelton, Cincinnati, OH, US;

(54) Bělící prostředky obsahující proteasové enzymy, čistící prostředky, prostředek pro čištění látek a způsob čištění látek

(57) Jsou posány bělící prostředky, které obsahují: a) efektivní množství proteasového enzymu, kterým je varianta karbonylové hydrolasy se sekvencí aminokyselin, která se v přírodě nevyskytuje a která je odvozena náhradou různých aminokyselin prekursorové karbonylové hydrolasy různými zbytky aminokyselin, v takové poloze prekursorové karbonylové hydrolasy, která odpovídá poloze +76 Bacillus amyloquefaciens subtilisinu v kombinaci s jednou nebo více polohami zbytků aminokyselin +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 a +274 Bacillus amyloquefaciens subtilisinu, b) bělící činidlo, kterým je buď organická peroxokyselina nebo kombinace aktivátoru bělícího činidla a peroxosloučeniny schopná poskytovat peroxid vodíku, který může reagovat s aktivátorem za vzniku organické perkyseliny in situ v bělícím roztoku vytvořeném z prostředku, a c) jeden nebo více materiálů čistícího prostředku slučitelným s proteasovým enzymem.

PV 1052-96

PŘÍL. 1
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
31. V. 96
DOŠLO

Bělící prostředky obsahující proteasové enzymy, čistící prostředky, prostředek pro čištění látek a způsob čištění látek

Oblast techniky

Tento vynález se týká bělících prostředků, které obsahují proteasové enzymy, čistících prostředků, prostředku pro čištění látek a způsobu čištění látek. Zvláště se tento vynález týká pracích prostředků a způsobů, které používají jeden nebo více proteasových enzymů, kterými jsou varianty karbonylové hydrolasy, a bělící systém s jedním nebo více bělícími činidly, zvláště aktivátory bělících činidel.

Dosavadní stav techniky

Tato přihláška je částečným pokračováním USA patentové přihlášky č. 08/136 626, podané 14. října 1993, a USA patentové přihlášky č. 08/237 938, podané 2. května 1994, které jsou zde celé uvedeny jako citace.

V pracích prostředcích jsou dlouhou dobu používány různé typy enzymů, které pomáhají odstraňovat některé skvrny z látek. Tyto skvrny typicky souvisejí s ušpiněním tuky a proteiny. Tyto enzymy však mají menší účinnost na jiné typy ušpinění a skvrn.

Dlouhou dobu je známo, že peroxidová bělící činidla jsou účinná pro odstraňování skvrn a nebo ušpinění z látek, ale tato bělící činidla jsou závislá na teplotě. Při teplotě prací vody 60 °C jsou peroxidová bělící činidla jenom částečně účinná. Jakmile se teplota prací vody sníží pod 60 °C, peroxidová bělící činidla se stávají relativně neúčinná. Důsledkem je, že se velká část průmyslového výzkumu věnuje účinným bělícím systémům.

Podle předloženého vynálezu bylo objeveno, že kombinace nových proteasových enzymů, které jsou variantami karbonylové hydrolasy, a bělících činidel, zvláště aktivátorů bělících či-

nidel, se dosáhne účinného odstranění skvrn a/nebo vyčištění zašlé špíny. Předmětem tohoto vynálezu je tedy získat bělící prostředky, zvláště prací detegentní prostředky, které mají zlepšené odstraňování skvrn a/nebo vyčištění zašlé špíny a/nebo schopnost čistit látek a/nebo bělící vlastnosti.

Tyto a další předměty předloženého vynálezu budou zřejmé z dále uvedeného podrobného popisu.

USA patent 4 634 551 Burnse a spol., vydaný 6. ledna 1987, popisuje amidoperoxidové bělící sloučeniny a jejich prekursory, které se používají podle předloženého vynálezu. Viz také USA patent 4 852 989 Burnse a spol., vydaný 1. srpna 1989. USA patent číslo 5 069 809 Lagerwaarda a spol., vydaný 3. prosince 1991, popisuje kombinaci NOBS aktivátorů bělících činidel s lipasovými enzymy, Lipolase. Viz evropský patent 341 947 Lagerwaarda a spol., publikovaný 15. listopadu 1989, pro diskusi slučitelnosti problémů lipasových enzymů s některými bělícími systémy. USA patent č. 4 545 784 Sandersona, vydaný 8. října 1985, popisuje absorpci aktivátorů na monohydrátu perboritanu sodného.

Podstata vynálezu

Tento vynález se týká bělících prostředků, které obsahují:

a) efektivní množství proteasového enzymu, kterým je varianta karbonylové hydrolasy se sekvencí aminokyselin, která se v přírodě nevyskytuje, která je odvozena náhradou více zbytků aminokyselin prekursorové karbonylové hydrolasy různými aminokyselinami, při čemž nichž mnohé aminokyselinové zbytky nahrazené v prekursorovém enzymu odpovídají poloze +76 v kombinaci s jedním nebo více následujícími zbytky: +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 a/ /nebo +274, kde číslo polohy odpovídá přirozeně se vyskytujícímu subtilisinu z Bacillus amyloliquefaciens nebo ekvivalentním aminokyselinovým zbytkům v jiných karbonylových hy-

drolasách nebo subtilisinech (jako je Bacillus lentus subtilisin),

b) bělící činidlo, kterým je buď organická perkyselina nebo kombinace bělícího aktivátoru a persloučeniny schopné poskytovat peroxid vodíku, který může reagovat s aktivátorem za vzniku organické perkyseliny in situ v bělícím roztoku vytvořeném z prostředku a

c) jeden nebo více materiálů čistícího prostředku slučitelných s proteasovým enzymem a bělícím činidlem.

Předložený vynález se týká také způsobů čistění látek tím, že se daná látka uvede do kontaktu, s výhodou mícháním, s vodným roztokem obsahujícím uvedené bělící prostředky. Tento způsob se může provádět za teplot pod 60 °C, ale je ovšem zcela účinný při teplotách praní až do teploty varu. Vodný prací roztok s výhodou obsahuje alespoň 300 ppm konvenčních detergentních složek a také alespoň 25 ppm aktivátoru bělících činidel a alespoň 25 ppm bělící sloučeniny. Uvedený vodný roztok s výhodou obsahuje 900 ppm až 20 000 ppm konvenčních detergentních složek, od 100 do 25 000 ppm bělící sloučeniny a od 100 do 2500 ppm aktivátoru bělících činidel.

Konvenční detergentní složky použité v tomto způsobu obsahují od 1 do 99,8 % hmotn., s výhodou od 5 do 80 % hmotn. čistícího činidla. Čistící prostředky mohou obsahovat také popřípadě od 5 do 80 % hmotn. detergentní stavební složky. V plně připravených detergentních/bělících prostředcích podle tohoto vynálezu jsou zahrnuty také jiné případné čistící složky.

Všechna procenta, poměry a díly jsou hmotnostní, pokud není uvedeno jinak. Všechny dokumenty, které jsou zde uvedeny, jsou zde zahrnuty jako citace.

V další části popisu je uveden stručný popis obrázků.

Obrázky 1 A až C ukazují sekvenci DNA a aminokyselin Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu a částečnou restrikční ma-

pu tohoto genu (sekvence id. č. 6).

Obrázek 2 ukazuje zachované zbytky aminokyselin subtilisinů z Bacillus amyloliquefaciens (BPN') a Bacillus lentus (přírodního typu).

Obrázky 3A a 3B ukazují sekvenci aminokyselin čtyř subtilisinů. Horní řádka ukazuje sekvenci aminokyselin subtilisinu z Bacillus amyloliquefaciens (někdy také nazývaného BPN') (sekv. id. č. 7). Druhá řádka ukazuje sekvenci aminokyselin subtilisinu z Bacillus subtilis (sekvence id. č. 8). Třetí řádka ukazuje sekvenci aminokyselin subtilisinu z B. licheniformis (sekvence id. č. 9). Čtvrtá řádka ukazuje sekvenci aminokyselin subtilisinu z Bacillus lentus (v PCT WO 89/06276 také označovaný jako subtilisin 309) (sekvence id. č. 10). Symbol * označuje nepřítomnost specifických zbytků aminokyselin při srovnání se subtilisinem BPN'.

Obrázek 4 ukazuje konstrukci plasmidu GGA274.

Obrázek 5 ukazuje konstrukci GGT274, který je meziproduktem některých expresních plasmidů použitých v této přihlášce.

Obrázky 6A a 6B ukazují sekvenci DNA a aminokyselin subtilisinu z Bacillus lentus (sekv. id. č. 11). Maturovaný subtilisinový protein je kodován kodony začínajícími kodonem GCG (334 až 336) odpovídajícím Ala.

Obrázky 7A a 7B ukazují sekvenci DNA a aminokyselin výhodného provedení podle vynálezu (N76D/S103A/V1041) (sekv. id. č. 12). DNA na tomto obrázku byla modifikována způsoby popsanými pro kodování aspartátu v poloze 76, alaninu v poloze 103 a isoleucinu v poloze 104. Maturovaný protein varianty subtilisinu je kodován kodony, které začínají kodonem GCG (334 až 336) odpovídajícím Ala.

Obrázek 8 ukazuje konstrukci vektoru pBCDAICAT.

Obrázek 9 popisuje konstrukci vektoru pUCCATFNA.

Bělící sloučeniny používané v předloženém vynálezu poskytují efektivní a účinné čištění látek, při kterém se odstraňují skvrny a/nebo ušpinění z látek. Bělící systémy v kombinaci s proteasovým enzymem jsou zvláště účinné při odstraňování většiny typů ušpinění z látek, včetně ušpinění proteiny a tuky, zašlé špíny, ušpinění velkým množstvím špíny, zvláště nukleofilní a tělesnou špínou.

Dále jsou podrobně popsány proteasové enzymy, bělící činidla (včetně perkyselinových a bělících systémů) a materiály čistících prostředků, včetně výhodných množství, používaných v tomto spisu.

Bělící prostředky obsahují bělící činidlo, které s výhodou tvoří 0,5 až 20 % hmotn. prostředku. Bělící činidlo je buď v podstatě nerozpustná, s výhodou pevná organická perkyselina nebo bělící systém, který obsahuje aktivátor bělícího činidla a peroxidovou bělící sloučeninu, která je schopna poskytovat peroxid vodíku nebo jde o kombinaci obojího. Perkyselina, která je v prostředku nebo která se tvoří kombinací aktivátoru a persloučeniny, má s výhodou karboxylovou kyselinu, která má hodnotu poměru hydrofilní k lipofilní části (HLB) v rozmezí od 3 do 6,5. Způsobem, který lze použít pro charakterizaci výhodných perkyselin (z aktivátorů nebo jako předem vytvořené perkyseliny), které jsou užitečné v předloženém vynálezu, je stupnice HLB, jak je to popsáno Daviesem J.T. "Proc. 2nd Int. Congr. Surface Activity 1, 426, Butterworths, Londýn (1957), zahrnuté sem jak citace. Tato HLB stupnice se při studiu povrchově aktivních činidel používá jako prostředek distribuce povrchově aktivního činidla mezi hydrofilní (vodě podobnou) a lipofilní (oleji podobnou) fázi. Tímto způsobem se hodnoty HLB mohou používat jako označení lipofilního (hydrofobního) charakteru aktivních bělících částic ve vodě (tj. schopnosti perkyseliny přecházet z prací vody a koncentrovat se na mezifázi špína/ /látka.

V tabulce A jsou uvedeny hodnoty HLB, které byly vypočteny pro vybrané perkyseliny (jako odpovídající karboxylové kyseliny). Výpočet HLB se provádí podle rovnice:

HLB = součet (čísel hydrofilních skupin) - součet (čísel lipofilních skupin) + 7

Hodnoty čísel hydrofilních skupin jsou [-C(O)OH & -N(H)C(O) = 2,1] a hodnoty čísel hydrofobních skupin jsou [alifatický/aromatický uhlík = 0,475 & alifatické atomy uhlíku mezi polárními skupinami jsou 1/2 hodnoty alifatických atomů uhlíku v uhlovodíkovém řetězci = 0,475/2]. Jako příklady: HLB hodnota větší než 7 ukazuje, že materiál je s výhodou rozpustný ve vodě, HLB hodnota nižší než 7 ukazuje zvýšení povrchové aktivity a hydrofobnosti.

Tabulka A
Hodnoty HLB různých perkyselin

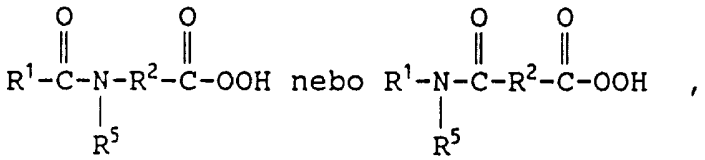
aktivátor/předem vytvořená perkys.	zkratka	perkyselina	HLB odpovídající karboxylové kys.
tetracetyl-ethylendiam	TAED	$CH_3C(O)OOH$	8,6
diperdodekandiová kyselina	DPDDA	$HOO(O)C(CH_2)_{10}$.-$C(O)OOH$	6,5
nonylamid perjantarové kys.	NAPSA	$CH_3(CH_2)_8N(H)C(O)$.$(CH_2)_2C(O)OOH$	6,4
benzoyloxybenzensulfonát	BOBS	$C_6H_5C(O)OOH$	6,3
nonylamidperadipové kyseliny	NAPAA	$CH_3(CH_2)_8N(H)C(O)$.$(CH_2)_4C(O)OOH$	6,0
nonanoyloxybenzensulfonát	NOBS	$CH_3(CH_2)_7C(O)OOH$	5,3
dekanoyloxybenzensulfonát	DOBS	$CH_3(CH_2)_8C(O)OOH$	4,8
perlaurová kys.	PLA	$CH_3(CH_2)_{10}C(O)OOH$	3,9

Jak zde bylo shora uvedeno, výhodným rozmezím hodnot HLB (odpovídající karboxylové kyseliny) perkyselin podle předloženého vynálezu (ať přidaných přímo nebo generovaných in situ) je rozmezí od 3,0 do 6,5. Výhodnějším rozmezím HLB hodnot (jako karboxylové kyseliny) perkyselin užitečných podle předloženého vynálezu (ať přidaných přímo nebo generovaných in situ) je rozmezí od 4,0 do 6,5. Nejvýhodnějším rozmezím HLB hodnot (jako karboxylové kyseliny) perkyselin užitečných podle předloženého vynálezu (ať přidaných přímo nebo generovaných in situ) je rozmezí od 4,0 do 6,0.

Předložený vynález zahrnuje detergentní prostředky obsahující efektivní množství proteasového enzymu a bělícího systému obsahujícího alespoň 0,1, s výhodou od 0,1 do 50 % hmotn. v podstatě nerozpustné organické perkyseliny. Perkyselina užitečná podle vynálezu je s výhodou obsažena v prostředku v množství od 0,5 do 20, výhodněji od 1 do 10, nejvýhodněji od 2 do 7 % hmotn. z hmotnosti prostředku.

Výhodné organické perkyseliny jsou vybrány ze skupiny sestávající ze 4-nonylamino-4-oxopermáselné kyseliny, 6-(nonyl-amino)-6-oxoperkapronové kyseliny, 1,12-diperdodekandiové kyseliny, heptylsulfonylperpropionové kyseliny, decylsulfonylperpropionové kyseliny, heptyl-, oktyl-, nonyl- a decyl-sulfonylpermáselné kyseliny a jejich směsí.

Z organických perkyselin jsou výhodnými amidoperkyseliny (amidovou skupinou substituované perkarboxylové kyseliny). Vhodné amidoperkyseliny pro použití v tomto vynálezu jsou popsány v USA patentech 4 634 551 a 4 686 063, oba Burnse a spol., vydané 6. ledna 1987 a 11. srpna 1987, oba jsou zde zahrnuty jako citace. Vhodnými amidoperkyselinami jsou sloučeniny obecného vzorce



v nichž R^1 znamená alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu

s 1 až 14 atomy uhlíku (s výhodou R^1 znamená alkylovou skupinu se 6 až 12 atomy uhlíku), R^2 znamená alkylenovou, arylenovou nebo alkarylenovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku (s výhodou R^2 znamená alkylenovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku) a R^5 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 10 atomy uhlíku (s výhodou R^5 znamená atom vodíku). Výhodněji R^1 znamená alkylovou skupinu s 8 až 10 atomy uhlíku a R^2 znamená alkylenovou skupinu se 2 až 4 atomy uhlíku.

Výhodnými pro použití v tomto vynálezu jsou také perfumaráty, které jsou popsány v USA patentu 4 852 989 Burnse a spol., vydaném 1. srpna 1989, který je zde zahrnut jako citace, a sulfonové perkyseliny (sulfonperkarboxylové kyseliny), které jsou popsány v USA patentech 4 758 369, 4 824 591 a 5 004 558, všechny Dryoffa a spol., vydaných 19. července 1988, 25. dubna 1989 a 2. dubna 1991, všechny jsou zde zahrnuty jako citace.

Příklad 1 USA patentu 4 686 063 obsahuje popis syntézy NAPSA, od sloupce 8, řádek 40, do sloupce 9, řádek 5, a NAPAA, od sloupce 9, řádek 15, do sloupce 9, řádek 65. Na konci syntézy amidoperkyseliny se reakce zastaví vodou, zfiltruje, promyje se vodou, aby se odstranil nadbytek kyseliny sírové (nebo jiné silné kyseliny, kterou se perkyselina vyrábí) a opět se zfiltruje.

Takto získaný vlhký koláč amidoperkyseliny se může uvést do kontaktu s fosforečnanovým pufrem při pH mezi 3,5 a 6, s výhodou mezi 4 a 5, podle USA patentu 4 909 953 Sadlowskiho a spol., vydaného 20. března 1990, které je zde zahrnut jako citace.

Před zahrnutím do konečného produktu se k amidoperkyselině mohou přidat další činidla pro stabilizaci při skladování a nebo pro exothermní regulaci. Například kyselina boritá, která je činidlem pro exothermní regulaci, popsaná v USA patentu č. 4 686 063 Burnse, vydaném 11. srpna 1987, který je zde zahrnut, se může smíchat s amidoperkyselinou (která byla promyta fosfo-

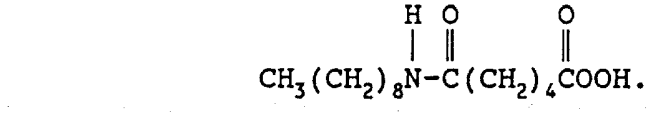
rečnanovým pufrem) v poměru 2:1 perkyselina:kyselina boritá. Amidoperkyselina promytá fosforečnanovým pufrem se může také smíchat s příslušným množstvím dipikolinové kyseliny a difosforečnanu sodného, chelatačním stabilizačním systémem. Chelatační činidla se mohou zahrnout do fosforečnanového pufru před uvedením do kontaktu s vlhkým koláčem.

Vlhký koláč se s výhodou vyrobí z částic s průměrným průměrem částic od 0,1 do 260 μm, s výhodou od 10 do 100 μm, nejvýhodněji od 30 do 60 μm. Žádoucí jsou krystaly NAPAA s malou velikostí částic. Viz USA patent 5 055 218 Gettyho a spol., vydaný 8. října 1991, který je zde zahrnut jako citace.

NAPAA filtrační koláč se s výhodou promyje dvakrát fosforečnanovým pufrem. Bylo zjištěno, že dvě postupná promytí fosforečnanovým pufrem vedou k optimální stabilitě NAPAA.

Výhodné jsou pevné (v kouscích) organické perkyseliny s teoretickým AvO (dostupný kyslík) mezi 3 a 12, nejvýhodněji mezi 5 a 7.

Nejvýhodnější pro použití v tomto vynálezu je NAPAA. Jiný název nonylamidu peradipové kyseliny (NAPAA) je 6-(nonylamino)--6-oxoperkapronová kyselina. Chemický vzorec NAPAA je



$$CH_3(CH_2)_8N(H)C(=O)(CH_2)_4C(=O)OOH.$$

Molekulová hmotnost NAPAA je 287,4.

Detergentní prostředky a bělící prostředky obsahující NAPAA zajišťují mimořádně účinné bělení povrchu látek. Skvrny a/nebo špína se z látek odstraní. Tyto prostředky jsou zvláště účinné při odstraňování zašlé špíny z látek.

NAPAA polární amid nebo skupina substituovaného amidu vede k perkyslině, která má velmi nízký tlak par a má tedy nízký profil vůně stejně jako vynikající bělící schopnost. Předpokládá se, že polarita amidové skupiny vede ke snížení tlaku par

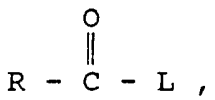
perkyseliny a ke zvýšení teploty tání.

NAPAA se může používat přímo jako bělící činidlo. Má snížený tlak par a dobrý profil vůně při použití při praní. NAPAA se může připravovat například nejdříve zreagováním NAAA (monononylamid kyseliny adipové), kyseliny sírové a peroxidu vodíku. Reakce se ukončí přidáním vody, potom se reakční směs zfiltruje, promyje se destilovanou vodou a odsátím se získá vlhký koláč. V promývání se může pokračovat dokud pH filtrátu není neutrální.

Je také výhodné, aby pH NAPAA (10 % hmotn. pevných částic ve vodě) bylo mezi 4,2 a 4,8. Překvapivě vede toto pH k tepelně stabilním částicím.

Jako bělící systémy se používají aktivátory bělících činidel a peroxidové bělící sloučeniny.

Aktivátor bělícícího činidla bělících systémů použitelných podle vynálezu mají následující obecný vzorec

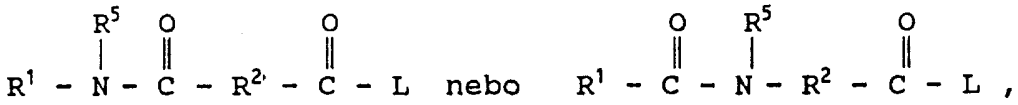


v němž R znamená alkylovou skupinu s 5 až 18 atomy uhlíku, při čemž nejdelší lineární alkylový řetězec znamená řetězec včetně karbonylového atomu uhlíku s 6 až 10 atomy uhlíku a L znamená odcházející skupinu, jako konjugát kyseliny má pKa v rozmezí od 4 do 13, s výhodou od 6 do 11, nejvýhodněji od 8 do 11.

L může znamenat v podstatě jakoukoliv odcházející skupinu. Odcházející skupinou může být jakákoliv skupina, kterou lze nahradit v aktivátoru bělícího činidla jako důsledek nukleofilního působení peroxidového aniontu na aktivátor bělícího činidla. Tato perhydrolyzační reakce vede k tvorbě perkaboxylové kyseliny. Skupina, aby byla vhodnou odcházející skupinou, musí obecně přitahovat elektrony. To usnadňuje nukleofilní atak peroxidovým iontem.

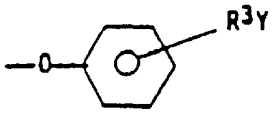
Skupina L musí být dostatečně reaktivní, aby k reakci došlo v optimálním čase (např. během cyklu praní). Jestliže je však L příliš reaktivní, tento aktivátor se bude těžko stabilizovat. Tyto vlastnosti jsou obvykle paralelní s pKa konjugátu kyseliny odcházející skupiny, i když jsou známy výjimky z tohoto pravidla.

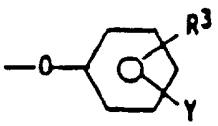
Výhodnými akvivátory bělících činidel jsou aktivátory obecných vzorců:

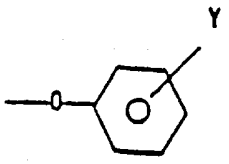


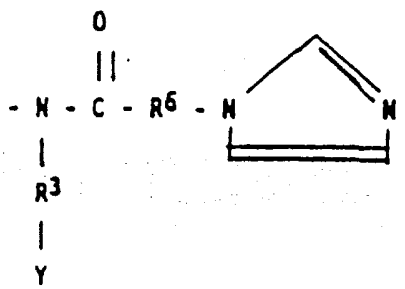
nebo

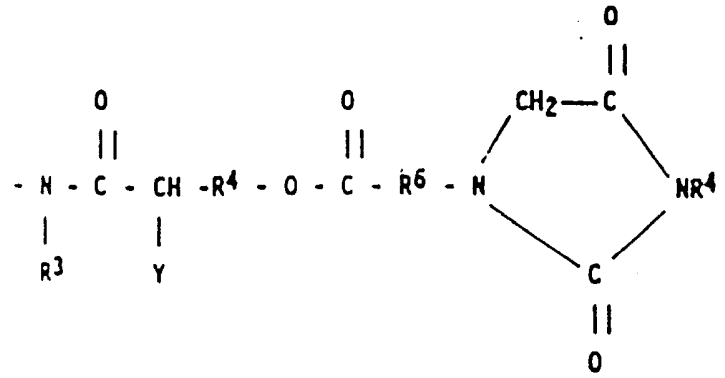
v nichž R^1 znamená alkylovou skupinu s 6 až 12 atomy uhlíku, R^2 znamená alkylenovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, R^5 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 10 atomy uhlíku a L znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z:

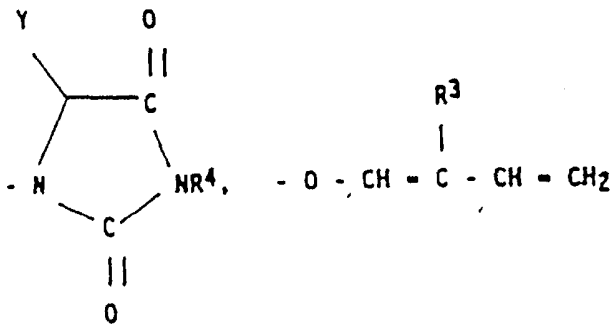


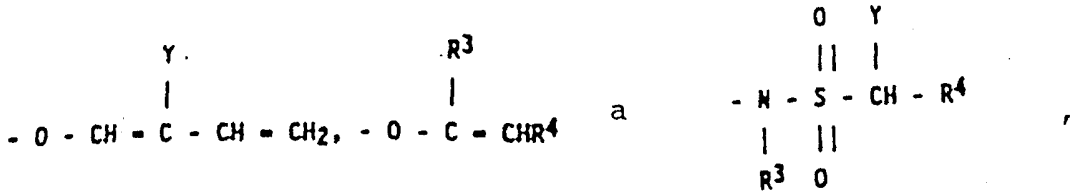




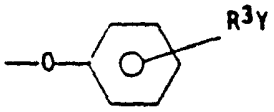






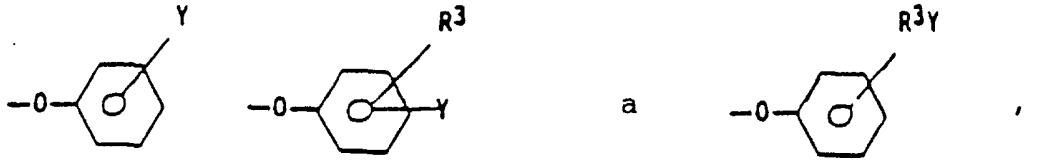


v nichž R^6 znamená alkylenovou, arylenovou nebo alkarylenovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^3 znamená alkylový řetězec s 1 až 8 atomy uhlíku, R^4 znamená atom vodíku nebo skupinu R^3 a Y znamená atom vodíku nebo solubilizující skupinu. Y znamená s výhodou skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající ze skupiny $-SO_3M+$, $-COO-M+$, $-SO_4-M+$, $(-N+R'_3)X-$ a $O<-N(R'_3)$, v nichž R' znamená alkylový řetězec s 1 až 4 atomy uhlíku, M znamená kation, který zajišťuje rozpustnost aktivátoru bělícího činidla a X znamená anion, který zajišťuje aktivátoru bělícího činidla rozpustnost. M s výhodou znamená kation alkalického kovu, amoniový nebo substituovaný amoniový kation s tím, že nejvýhodnější je kation sodný nebo draselný, a X znamená anion, který je vybrán ze skupiny sestávající z halogenidového, hydroxidového, methylsulfátového a acetátového aniontu. Výhodněji Y znamená skupinu $-SO_3M+$ nebo $-COO-M+$. Je třeba poznamenat, že aktivátory bělících činidel s odcházející skupinou, která neobsahuje solubilizující skupinu, by měly být dobře dispergovány v bělícím roztoku, aby napomáhaly při jejich rozpuštění. Výhodnou je skupina obecného vzorce



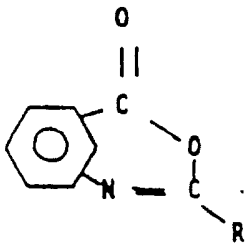
v němž R^3 znamená jak shora uvedeno a Y znamená skupinu $-SO_3-M+$ nebo $-COO-M+$, kde M znamená jak shora uvedeno.

Zvláště výhodnými aktivátory bělících činidel jsou ty aktivátory, v nichž R^1 znamená lineární alkylový řetězec s 6 až 12 atomy uhlíku, R^2 znamená lineární alkylenový řetězec se 2 až 6 atomy uhlíku, R^5 znamená atom vodíku a L znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající ze skupiny



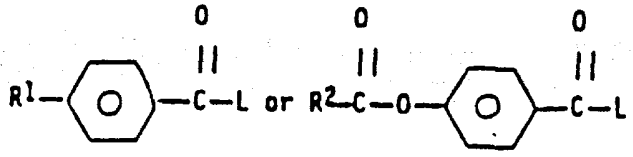
v nichž R^3 znamená jak shora uvedeno, Y znamená skupinu $-SO_3-M+$ nebo $-COO-M+$ a M znamená jak shora uvedeno.

Výhodným aktivátorem bělícího činidla je sloučenina obecného vzorce



v němž R znamená atom vodíku, alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu. Tato sloučenina je popsána v USA patentu číslo 4 966 723 Hodgeho a spol., který je zde zahrnut jako citace.

Výhodnými aktivátory bělících činidel jsou sloučeniny obecného vzorce

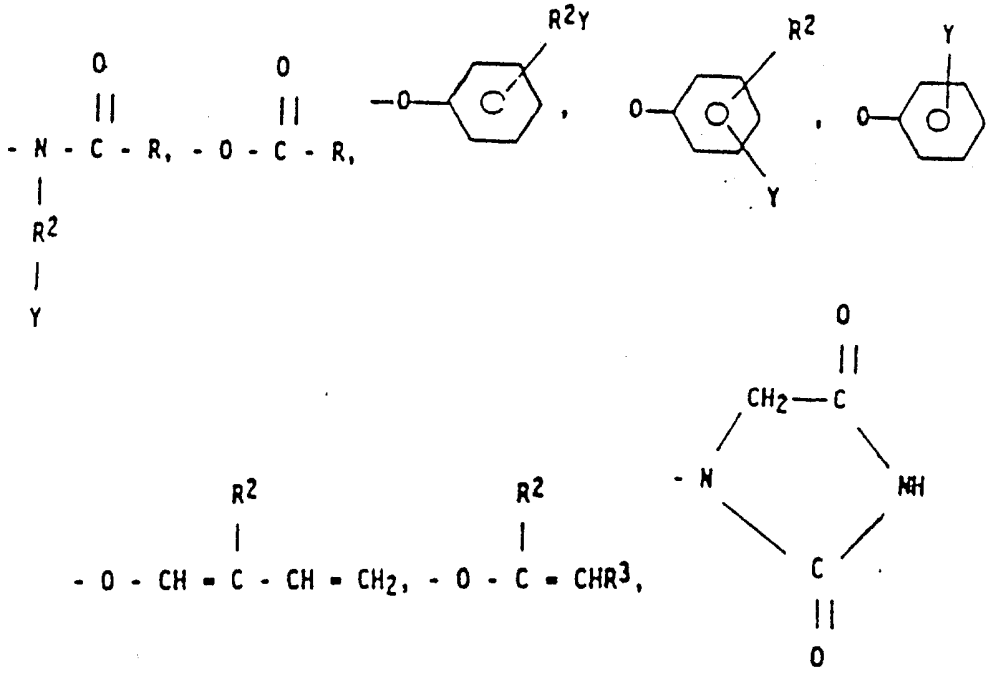


v němž R^1 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, R^2 znamená alkylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku a L znamená jak shora uvedeno.

Výhodnými aktivátory bělících činidel jsou aktivátory shora uvedeného obecného vzorce, v němž L znamená jak shora uvedeno v obecném vzorci a R^1 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku.

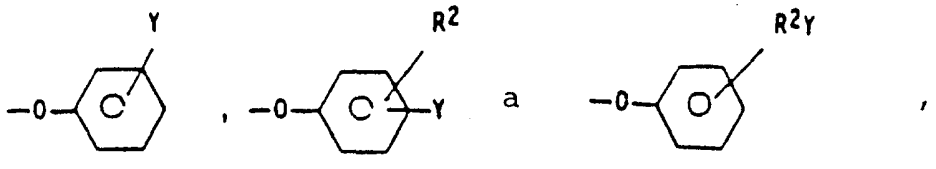
Ještě výhodnější jsou aktivátory bělících činidel shora uvedeného obecného vzorce, v němž L znamená jak shora uvedeno v obecném vzorci a R^1 znamená atom vodíku.

Výhodnější aktivátorybělících činidel jsou ty aktivátory shora uvedeného obecného vzorce, v němž R znamená lineární alkylový řetězec s 5 až 9 atomy uhlíku, s výhodou 6 až 8 atomy uhlíku, a L znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající ze skupin obecných vzorců



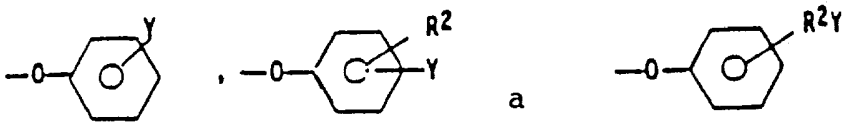
v nichž R, R^2, R^3 a Y znamenají jak shora uvedeno.

Zvláště výhodnými aktivátory bělících činidel jsou ty aktivátory shora uvedeného obecného vzorce, v němž R znamená alkylovou skupinu s 5 až 12 atomy uhlíku, v nichž nejdelší lineární část alkylového řetězce od a včetně karbonylového atomu uhlíku znamená skupinu s 6 až 10 atomy uhlíku a L znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající ze skupin obecných vzorců



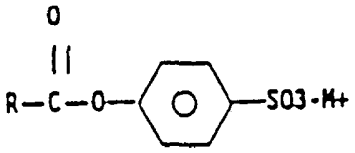
v nichž R^2 znamená alkylový řetězec s 1 až 8 atomy uhlíku a Y znamená skupinu $-SO_3-M+$ nebo -COO-M+, kde M znamená kation alkalického kovu, amoniový nebo substituovaný amoniový kation.

Zvláště výhodnými aktivátory bělících činidel jsou ty aktivátory shora uvedeného obecného vzorce, v němž R znamená lineární alkylový řetězec s 5 až 9, s výhodou 6 až 8, atomy uhlíku a L znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající ze skupin obecných vzorců



v nichž R^2 znamená jak shora uvedeno a Y znamená skupinu $-SO_3-M+$ nebo -COO-M+, kde M znamená jak shora uvedeno.

Výhodnými aktivátory bělících činidel jsou sloučeniny obecného vzorce



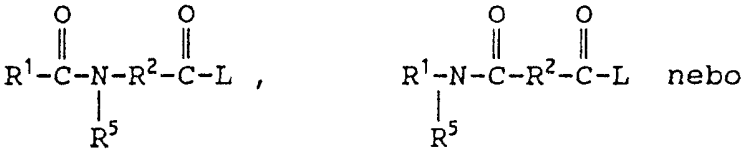
v němž R znamená lineární alkylový řetězec s 5 až 9, s výhodou 6 až 8, atomy uhlíku a M znamená sodík nebo draslík.

S výhodou aktivátor bělícího činidla podle vynálezu znamená nonanoyloxybenzensulfonát sodný (NOBS) nebo benzoyloxybenzensulfonát sodný (BOBS).

Zvláště výhodnými bělícími prostředky pro použití podle předloženého vynálezu jsou následující aktivátory bělících činidel, které jsou zvláště bezpečné pro použití v pračkách, které mají části z přírodního kaučuku. Předpokládá se, že jde o důsledek nikoliv produkce olejovitých diacylperoxidových částic (DAP) perhydrolyzační reakcí těchto aktivátorů bělících činidel odvozených od amidokyselin, ale spíše o důsledek tvorby nerozpustných krystalických pevných DAP. O těchto pevných látkách

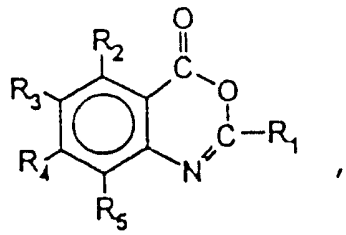
se předpokládá, že netvoří potahový film a tedy části z přírodního kaučuku nejsou vystaveny působení DAP po delší dobu. Tyto výhodné aktivátory bělících činidel jsou členy skupiny sestávající z:

a) aktivátoru bělícího činidla obecného vzorce



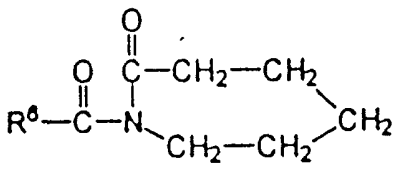
jejich směsí, v nichž R^1 znamená alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^2 znamená alkylenovou, arylenovou nebo alkarylenovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^5 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 10 atomy uhlíku a L znamená odcházející skupinu,

b) aktivátorů bělících činidel benzoxazinového typu obecného vzorce



v nichž R_1 znamená atom vodíku nebo alkylovou, alkarylovou, arylovou nebo arylalkylovou skupinu a R_2, R_3, R_4 a R_5 mohou znamenat stejné nebo různé substituenty, které jsou vybrány ze skupiny sestávající z atomu vodíku, atomu halogenu, alkylové, alkenylové, arylové, hydroxylové, alkoxylové, aminové a alkylaminové skupiny, skupiny $COOR_6$ (kde R_6 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu) a karbonylové skupiny,

c) N-acyl-kaprolaktamových aktivátorů bělících činidel obecného vzorce



v němž R^6 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou, alkoxyarylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 12 atomy

uhlíku, a

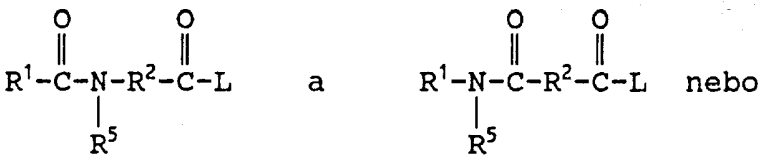
d) směsí a), b) a c).

Výhodnými aktivátory bělících činidel typu ad a) jsou ty aktivátory, v nichž R^1 znamená alkylovou skupinu s 6 až 12 atomy uhlíku, R^2 znamená skupinu s 1 až 8 atomy uhlíku a R^5 znamená atom vodíku nebo methylovou skupinu. Zvláště výhodnými aktivátory bělících činidel jsou aktivátory shora uvedených obecných vzorců, v nichž R^1 znamená alkylovou skupinu se 7 až 10 atomy uhlíku a R^2 znamená skupinu se 4 až 5 atomy uhlíku.

Výhodnými aktivátory bělících činidel typu ad b) jsou ty aktivátory, v nichž R_2, R_3, R_4 a R_5 znamenají atom vodíku a R_1 znamená fenylovou skupinu.

Výhodnými acylovými skupinami uvedených N-acyl-kaprolaktamových aktivátorů bělících činidel typu c) jsou skupiny obecného vzorce R^6-CO-, v němž R^6 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou, alkoxyarylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 12 atomy uhlíku, s výhodou se 6 až 12 atomy uhlíku. Ve vysoce výhodných provedeních R^6 znamená člen vybraný ze skupiny, která sestává z fenylové, heptylové, oktylové, nonylové, 2,4,4-trimethylpentylové a decenylové skupiny a jejich směsí.

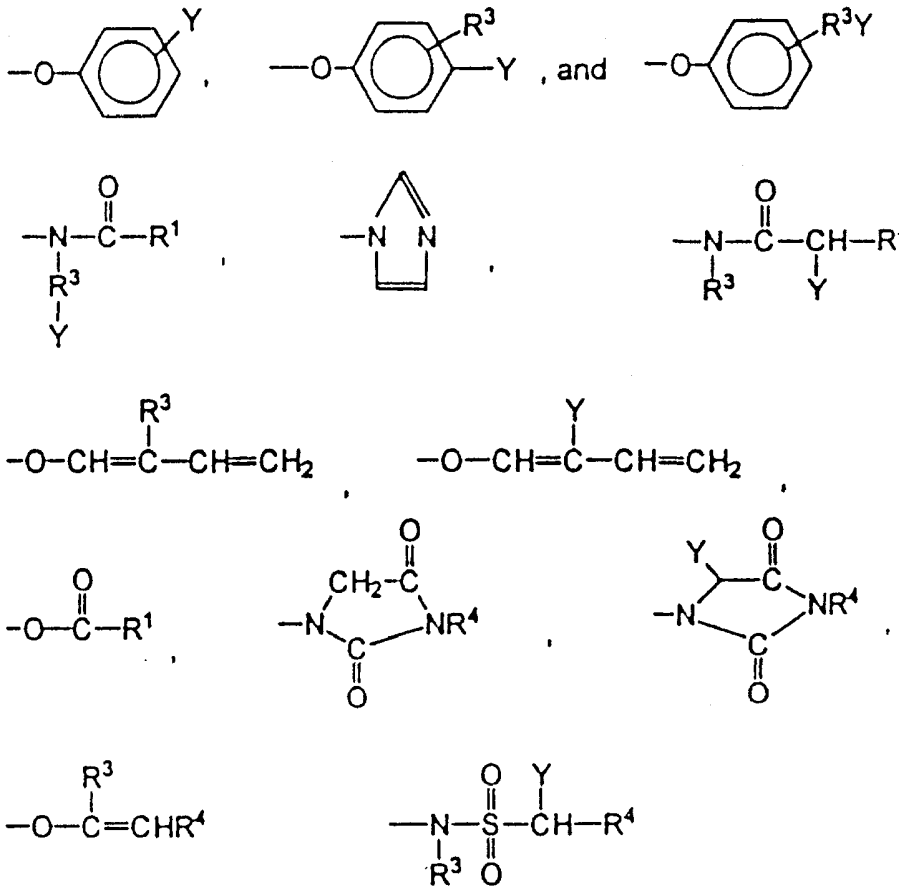
Aktivátory bělících činidel typu a) používané v předloženém vynálezu znamenají amidem substituované sloučeniny obecných vzorců



a

nebo

jejich směsí, v nichž R^1, R^2 a R^5 znamenají jak shora uvedeno a L znamená v podstatě jakoukoliv odcházející skupinu. Výhodnými aktivátory bělících činidel jsou aktivátory shora uvedeného obecného vzorce, v němž R^1, R^2 a R^5 znamenají jak shora uvedeno pro perkyselinu a L znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající ze skupin obecných vzorců

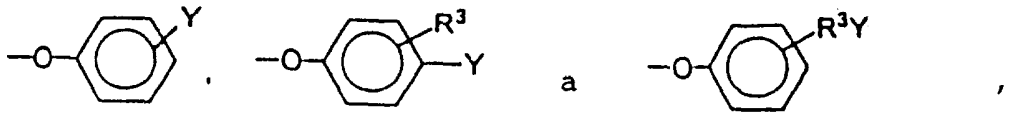


a jejich směsí, v nichž R^1 znamená alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^3 znamená alkylový řetězec s 1 až 8 atomy uhlíku, R^4 znamená atom vodíku nebo R^3 a Y znamená atom vodíku nebo solubilizující skupinu.

Výhodnými solubilizující skupinami jsou skupiny $-SO_3^-M^+$, $-COO^-M^+$, $-SO_4^-M^+$, $-N^+(R^3)X^-$ a $O<-N(R^3)_3$, nejvýhodněji $-SO_3^-M^+$, $-COO^-M^+$, v nichž R^3 znamená alkylový řetězec s 1 až 4 atomy uhlíku, M znamená kation, který zajišťuje rozpustnost aktivátoru bělícího činidla a X znamená anion, který zajišťuje rozpustnost aktivátoru bělícího činidla, M s výhodou znamená kation alkalického kovu, amoniový nebo substituovaný amoniový kation s tím, že nejvýhodnější je kation sodný a draselný, a X znamená halogenidový, hydroxidový, methylsulfátový a acetátový anion. Je třeba poznamenat, že aktivátory bělících činidel s odcházející skupinou, která neobsahuje solubilizující skupiny, by měly

být dobře dispergovány v bělícím roztoku, aby napomáhaly při jejich rozpuštění.

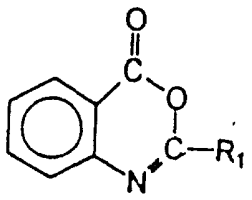
Výhodnými aktivátory bělících činidel jsou aktivátory shora uvedeného obecného vzorce, v němž L znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající ze skupin obecných vzorců



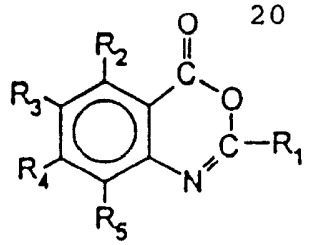
v nichž R^3 znamená jak shora uvedeno a Y znamená skupinu $-SO_3^-M^+$ nebo $-COO^-M^+$, v nichž M znamená jak shora uvedeno.

Jiná důležitá skupina aktivátorů bělících činidel, včetně aktivátorů typu b) a c), poskytuje oragnické perkyseliny, jak je zde popsáno, jako důsledek nukleofilního ataku na karbonylový atom uhlíku kruhu perhydroxidového aniontu. Například tato reakce, při které se otevírá kruh v aktivátorech typu c), zahrnuje atak na kaprolaktamový kruhový karbonyl peroxidem nebo jeho aniontem. Jelikož k ataku peroxidem vodíku nebo jeho aniontem na acylkaprolaktam dochází s výhodou na exocyklickém karbonylu, může být pro otevření kruhu zapotřebí katalyzátor. Jiné příklady aktivátorů bělících činidel otevírajících kruh lze nalézt v aktivátorech typu b), jako jsou ty, které jsou popsány v USA patentu č. 4 966 723 Hodgeho a spol., vydaném 30. října 1996.

Mezi aktivátory bělících činidel typu benzoxazinu popsané Hodgem patří aktivátory obecného vzorce

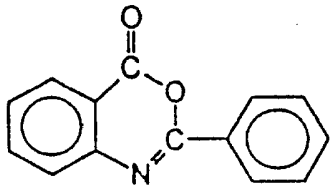


včetně substituovaných benzoxazinů obecného vzorce



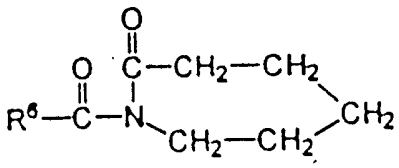
v nichž R_1 znamená atom vodíku, alkylovou, alkarylovou, arylovou nebo arylalkylovou a R_2, R_3, R_4 a R_5 mohou znamenat stejné nebo různé substituenty, které jsou vybrány ze skupiny sestávající z atomu vodíku, atomu halogenu, alkylové, alkenylové, arylové, hydroxylové, alkoxylové, aminové a alkylaminové skupiny, skupiny $COOR_6$ (kde R_6 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu) a karbonylové skupiny.

Výhodným aktivátorem benzoxazinového typu je sloučenina vzorce



Jestliže se používají aktivátory, optimálního bělení povrchu se dosáhne promývacími roztoky, jejichž pH je mezi 8,5 a 10,5, s výhodou mezi 9,5 a 10,5, aby se dosáhlo perhydrolyzační reakce. Toto pH se může dosáhnout látkami obvykle známými jako pufrovací činidla, která jsou případnými složkami zde uvedených bělících systémů.

N-Acyl-kaprolaktamové aktivátory bělících činidel tyu c) používané podle předloženého vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce



v němž R^6 znamená atom vodíku, alkylovou, arylovou, alkoxyarylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 12 atomy uhlíku. Kaprolaktamové aktivátory, v nichž skupina R^6 znamená skupinu s ale-

spoň 6, s výhodou 6 až 12 atomy uhlíku, poskytují hydrofobní bělící činidla, která poskytují čištění nukleofilní a nebo tělesné špíny, jak shora uvedeno. Kaprolaktamové aktivátory, v nichž R^6 obsahuje 1 až 6 atomů uhlíku, poskytují hydrofilní bělící částice, které jsou zvláště účinné při bělení nápojových skvrn. Směsi hydrofobních a hydrofilních kaprolaktamů, typicky v hmotnostních poměrech 1:5 až 5:1, s výhodou 1:1, se mohou používat pro odstraňování směsných skvrn.

Vysoce výhodné N-acyl-kaprolaktamy jsou vybrány ze skupiny sestávající z benzoylkaprolaktamu, oktanoylkaprolaktamu, nonanoylkaprolaktamu, 3,5,5-trimethylhexanoylkaprolaktamu, dekanoylkaprolaktamu, undekanoylkaprolaktamu a jejich směsí. Směsi pro výrobu N-acylkaprolaktamů jsou dobře známy v oblasti techniky.

Na rozdíl od popisu USA patentu 4 545 784 aktivátor bělícího činidla se s výhodou neadsorbuje na peroxidové bělící sloučenině. Jestliže k tomu dochází v přítomnosti jiných organických čistících složek, může to způsobit bezpečnostní problémy.

Aktivátory bělících činidel typu a), b) nebo c) budou obsaženy v bělícím systému nebo v detergentním prostředku v množství alespoň 0,1, s výhodou od 0,1 do 50, výhodněji od 1 do 30 a nejvýhodněji od 3 do 25 % hmotn.

Výhodné aktivátory bělících činidel odvozené od amidu nebo kaprolaktamové aktivátory bělících činidel se mohou používat také v kombinaci s hydrofilními aktivátory bezpečnými pro gumu a enzymy, jako je TAED, typicky v množstvích aktivátor odvozený od amidu nebo kaprolaktamový aktivátor:TAED v poměru 1:5 až 5:1, s výhodou 1:1.

Mechanismu bělení a zvláště bělení povrchu není zcela porozuměno. Obecně se však předpokládá, že aktivátor bělícího činidla podléhá nukleofilnímu účinku peroxidového aniontu, kte-

rý se generuje z peroxidu vodíku uvolňovaného peroxidovým bělidlem za vzniku perkarboxylové kyseliny. Tato reakce se obvykle nazývá perhydrolýza.

Jestliže se tyto aktivátory používají, optimálního bělícího účinku na povrch se dosáhne promývacími roztoky, jejichž pH je mezi 8,5 a 10,5, s výhodou mezi 9,5 a 10,5, aby se usnadnila perhydrolyzační reakce. Tohoto pH se může dosáhnout látkami, které jsou známy jako pufrovací činidla a které jsou případnými složkami zde uvedených bělících systémů.

Peroxidové bělící systémy, které jsou zde užitečné, jsou systémy, které jsou schopny poskytovat peroxid vodíku ve vodném prostředí. Tyto sloučeniny jsou dobře známy odborníkům z oblasti techniky. Patří mezi ně peroxid vodíku a peroxidy alkalických kovů, organické peroxidové bělící sloučeniny, jako je peroxid močoviny, a bělící sloučeniny typu anorganických persolí, jako jsou perboritany alkalického kovu, peruhličitany, perfosforečnany a podobné. Jestliže je to žádoucí, mohou se používat směsi dvou nebo více těchto bělících sloučenin.

Mezi výhodné peroxidové bělící sloučeniny patří perboritan sodný, komerčně dostupný ve formě mono-, tri- a tetra-hydrátu, perhydrát pyrofosforečnanu sodného, perhydrát močoviny, peruhličitan sodný a peroxid sodný. Zvláště výhodnými jsou tetrahydrát perboritanu sodného, monohydrát perboritanu sodného a peruhličitan sodný. Zvláště výhodný je peruhličitan, protože je během skladování velmi stálý a přesto se rychle rozpouští v bělící kapalině. Předpokládá se, že toto rychlé rozpouštění vede k tvorbě vyšších hladin perkarboxylové kyseliny a tedy ke zvýšenému účinku bělení povrchu.

Vysoce výhodný peruhličitan může být v nepotažené nebo v potažené formě. Průměrná velikost částic nepotaženého peruhličitanu je v rozmezí od 400 do 1200 μm, nejvýhodněji od 400 do 600 μm. Jestliže se používá potažený peruhličitan, pak mezi výhodné potahovací materiály patří směsi uhličitanu a síranu,

křemičitanu a borokřemičitanu nebo mastných karboxylových kyselin.

Peroxidová bělící sloučenina je obsažena v bělícím systému nebo detergentním prostředku v množství alespoň 0,1, s výhodou 1 až 75, výhodněji 3 až 40 a nejvýhodněji 3 až 25 % hmotn.

Hmotnostní poměr aktivátoru bělícího činidla k peroxidové bělící sloučenině v bělícím systému je typicky v rozmezí od 2:1 do 1:5. Výhodné poměry jsou v rozmezí od 1:1 do 1:3.

Molární poměr peroxidu vodíku působením peroxidové bělící sloučeniny na aktivátor bělícího činidla je větší než 1,0, výhodněji větší než 1,5 a nejvýhodněji od 2,0 do 10. Bělící prostředky podle vynálezu jsou v bělící peroxidové sloučenině obsaženy v množství od 0,5 do 20, nejvýhodněji od 1 do 10 % hmotn.

Systémy aktivátor bělícího činidla/bělící sloučenina podle vynálezu jsou užitečné samy o sobě jako bělící činidla. Tyto bělící systémy jsou však zvláště užitečné v prostředcích, které obsahují různá množství čistících složek, jako jsou povrchově aktivní činidla, stavební složky apod.

Tento vynález zahrnuje proteasové enzymy, které jsou nepřirozeně se vyskytujícími variantami karbonylové hydrolasy s různými vlastnostmi týkajícími se proteolytické aktivity, stability, substrátové specifičnosti, pH profilu a/nebo provedení, při srovnání s prekursorovou karbonylovou hydrolasou, od níž je odvozena varianta sekvence aminokyselin. Prekursorovou karbonylovou hydrolasou může být přirozeně se vyskytující karbonylová hydrolasa nebo rekombinantní hydrolasa. Takové varianty karbonylové hydrolasy mají sekvenci aminokyselin, která se v přírodě nevyskytuje a která je odvozena nahrazením více zbytků aminokyselin prekursorové karbonylové hydrolasy různými aminokyselinami. Tyto mnohé aminokyselinové zbytky prekursorového enzymu odpovídají poloze +76 v kombinaci s jedním nebo více ná-

sledujícími zbytky: +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 a/nebo +274, kde číslo polohy odpovídá přirozeně se vyskytujícímu subtilisinu z Bacillus amyloliquefaciens nebo ekvivalentním aminokyselinovým zbytkům v jiných karbonylových hydrolasách nebo subtilisinech, jako je Bacillus lentus subtilisin.

Varianty karbonylové hydrolasy, které jsou proteasovým enzymem užitečným v prostředcích podle předloženého vynálezu, zahrnují náhradu zbytky aminokyseliny v poloze +76 v kombinaci s jednou nebo více dalšími modifikacemi. Varianty proteasových enzymů užitečných podle předloženého vynálezu zahrnují substituci, deleci nebo inserci zbytků aminokyselin v následujících kombinacích: 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 a 76/103/104/222. Nejvýhodnější enzymové varianty podle předloženého vynálezu zahrnují substituci, deleci nebo inserci zbytku aminokyseliny v následující kombinaci zbytků: 76/99, 76/104, 76/99/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/101/103/104, 76/99/101/ /103/104 a 76/101/104 B. amyloliquefaciens subtilisinu.

Sekvence variantní DNA kodující takovou karbonylovou hydrolasu nebo varianty subtilisinu jsou odvozeny od sekvence prekursorové DNA, která koduje přirozeně se vyskytující nebo rekombinantní prekursorový enzym. Sekvence variantní DNA jsou odvozeny modifikováním sekvence prekursorové DNA, takže kodují substituci jednoho nebo více specifických zbytků aminokyselin kodovaných sekvencí prekursorové DNA odpovídající polohám 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

a/nebo 274 v Bacillus amyloliquefaciens nebo jakoukoliv jejich kombinaci. I když zbytky aminokyselin zde uvedené modifikace jsou identifikovány podle očíslování aplikovatelného na B. amyloliquefaciens (což je konvenční způsob identifikování poloh zbytků ve všech subtilisinech), výhodná sekvence prekursorové DNA užitečné v předloženém vynálezu znamená sekvenci DNA Bacillus lentus, jak je uvedena na obrázku 6 (sekvence id. č. 11).

Tyto sekvence variant DNA kodují inserci nebo substituci zbytku aminokyseliny v poloze 76 v kombinaci s jednou nebo více dalšími modifikacemi. Sekvence variant DNA s výhodou kodují substituci nebo inserci zbytků aminokyselin v následujících kombinacích: 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 a/nebo 76/103/104/222. Nejvýhodnější sekvence variant DNA kodují modifikaci následujících kombinací zbytků: 76/99, 76/104, 76/99/104, 76/103/104, 76/104/ /107, 76/101/103/104, 76/99/ /101/103/104 a 76/101/104. Tyto sekvence rekombinantní DNA kodují varianty karbonylové hydrolasy s novou sekvencí aminokyselin a obecně alespoň jednu vlastnost, která je podstatně odlišná od stejné vlastnosti enzymu kodovaného sekvencí DNA prekursorové karbonylové hydrolasy. Mezi tyto vlastnosti patří vlastnosti týkající se proteolytické aktivity, subtrátové specifičnosti, stability, změněného pH profilu a/nebo zlepšeného provedení.

Proteasové enzymy, které jsou zde užitečné, zahrnují substituci kterékoliv z 19 přirozeně se vyskytujících L-aminokyselin v navržených polohách zbytků aminokyselin. Tyto substituce lze udělat v jakémkoliv prekursorovém subtilisinu (prokaryotický, eukaryotický, savčí atd.). V této přihlášce se na různé

aminokyseliny odkazuje obvyklým jedno- nebo tří-písmenkovým kodem. Tyto kody jsou identifikovány v knize Dale J.W.: "Molecular Genetics of Bacteria", John Wiley and Sons, Ltd., Appendix B (1989).

Substituce se s výhodou provádí v každé z uvedených poloh zbytků aminokyselin, ale bez omezení jenom na tyto: substituce v poloze 76 zahrnující D, H, E, G, F, K, P a N, substituce v poloze 99 zahrnující D, T, N, Q, G a S, substituce v poloze 101 zahrnující G, D, K, L, A, E, S a R, substituce v poloze 103 zahrnující Q, T, D, E, Y, K, G, R, S a A, substituce v poloze 104 zahrnující všech 19 přirozeně se vyskytujících aminokyselin, substituce v poloze 107 zahrnující V, L, M, Y, G, E, F, T, S, A, N a I, substituce v poloze 123 zahrnující N, T, I, G, A, C a S, substituce v poloze 27 zahrnující K, N, C, V a T, substituce v poloze 105 zahrnující A, D, G, R a N, substituce v poloze 107 zahrnující A, L, V, Y, G, F, T, S a A, substituce v poloze 109 zahrnující S, K, R, A, N a D, substituce v poloze 126 zahrnující A, F, I, V a G, substituce v poloze 128 zahrnující G, L a A, substituce v poloze 135 zahrnující A, F, I, S a V, substituce v poloze 156 zahrnující D, E, A, G, Q a K, substituce v poloze 166 zahrnující všech 19 přirozeně se vyskytujících aminokyselin, substituce v poloze 195 zahrnující E, substituce v poze 197 zahrnující E, substituce v poloze 204 zahrnující A, G, C, S a D, substituce v poloze 206 zahrnující L, Y, N, D a E, substituce v poloze 210 zahrnující L, I, S, C a F, substituce v poloze 216 zahrnující V, E, T a K, substituce v poloze 217 zahrnující všech 19 přirozeně se vyskytujících aminokyselin, substituce v poloze 218 zahrnující S, A, G, T a V, substituce v poloze 222 zahrnující všech 19 přirozeně se vyskytujících aminokyselin, substituce v poloze 260 zahrnující P, N, G, A, S, C, K a D, substituce v poloze 265 zahrnující N, G, A, S, C, K, Y a H a substituce v poloze 274 zahrnující A a S. Specificky výhodná (výhodné) aminokyselina (aminokyseliny) pro substituování v každé z těchto poloh je (jsou) navržena (navrženy) v tabulce I. I když jsou v tabulce I uvedeny specifické aminokyseliny, mělo by tomu být porozuměno tak, že uvede-

né zbytky lze substituovat jakoukoliv aminokyselinou.

Tabulka I

zbytek aminokyseliny	výhodná aminokyselina, která se substituuje/vkládá
+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

Tyto proteasové enzymy obsahující in vitro mutace v B. len-

tus subtilisinu na zbytku aminokyselin ekvivalentní +76 v Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu produkuje subtilisinové varianty vykazující změněnou stabilitu (např. modifikovanou autoproteolytickou stabilitu) při srovnání s prekursorovými subtilisiny (viz tabulky IV a VI).

Také in vitro mutace na zbytcích ekvivalentních +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 a/nebo +274 v Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu samotném, ve vzájemné kombinaci nebo v jakékoliv kombinaci s +76 mutacemi, produkuje varianty subtilisinu vykazující změněné vlastnosti, jako změněnou proteolytickou aktivitu, změněnou tepelnou stabilitu, změněný pH profil, změněnou substrátovou specifičnost a/nebo změněné provedení.

Karbonylové hydrolasy znamenají proteasové enzymy, které hydrolyzují sloučeniny obsahující vazby obecného vzorce



v němž X znamená atom kyslíku nebo dusíku. Patří mezi ně přirozeně se vyskytující karbonylové hydrolasy a rekombinantní karbonylové hydrolasy. Mezi přirozeně se vyskytující karbonylové hydrolasy principielně patří hydrolasy, např. peptidové hydrolasy, jako jsou subtilisiny nebo metalloproteasy. Mezi peptidové hydrolasy patří α-aminoacylpeptidová hydrolasa, peptidylaminokyselinová hydrolasa, acylaminová hydrolasa, serinová karboxypeptidasa, metallokarboxypeptidasa, thiolproteinasa, karboxylproteinasa a metalloproteinasa. Patří sem serinové, metallo-, thio- a kyselinové proteasy stejně jako endo- a exo-proteasy.

"Rekombinantní karbonylová hydrolasa" znamená takovou karbonylovou hydrolasu, v níž je sekvence DNA kodující přirozeně se vyskytující karbonylovou hydrolasu modifikována tak, že produkuje sekvenci mutované DNA, která koduje substituci, inserci nebo deleci jedné nebo více aminokyselin v sekvenci aminokyse-

lin karbonylové hydrolasy. Vhodné způsoby modiikace jsou popsány zde a v USA patentu č. 4 760 025 (Re 34 606), USA patentu č. 5 204 015 a USA patentu č. 5 185 258, které jsou zde zahrnuty jako odkazy.

Subtilisiny jsou bakteriální nebo plísňové karbonylové hydrolasy, které obvykle štěpí peptidové vazby proteinů nebo peptidů. Pojem "subtilisin" tak, jak se zde používá, znamená přirozeně se vyskytující subtilisin nebo rekombinantní subtilisin. Je známo, že řady přirozeně se vyskytujících subtilisinů jsou produkovány a často sekretovány různými mikrobiálními druhy. Sekvence aminokyselin členů těchto serií nejsou zcela homologní. Subtilisiny v těchto seriích však vykazují stejný nebo podobný typ proteolytické aktivity. Tyto skupiny serinových proteas sdílejí obvyklou sekvenci aminokyselin definující katalytickou triadu, která je odlišuje od skupiny serinových proteas souvisejících s chymotrypsinem. Jak subtilisiny tak serinové proteasy související s chymotrypsinem mají katalytickou triádu obsahující aspartát, histidin a serin. U proteas souvisejících se subtilisinem je relativní pořadí těchto aminokyselin, čteno od aminového ke karboxylovému konci, aspartát-histidin-serin. U proteas souvisejících s chymotrypsinem je však relativní pořadí histidin-aspartát-serin. Subtilisin zde uvedený se tedy týká serinové proteasy, která má katalytickou triadu proteas související se subtilisinem. Mezi příklady patří, ale nejsou na ně omezeny, subtilisiny uvedené zde na obrázku 3.

"Rekombinantní subtilisin" znamená subtilisin, v němž sekvence DNA kodující subtilisin je modifikována tak, že produkuje sekvenci variantní (nebo mutantní) DNA, která koduje substituci, deleci nebo inserci jedné nebo více aminokyselin v sekvenci aminokyselin přirozeně se vysytujícího subtilisinu. Mezi vhodné způsoby, kterými se tato modifikace připravuje a které mohou být kombinovány s těmi, které jsou zde popsány, patří způsoby popsané v USA patentu 4 760 025 (RE 34 606), USA patentu číslo 5 204 015 a USA patentu 5 185 258.

"Nelidské karbonylové hydrolasy" a DNA kodující tyto hydrolasy mohou být získány z mnoha prokaryotických a eukaryotických organismů. Mezi vhodné příklady prokaryotických organismů patří gramnegativní organismy, jako je E. coli nebo Pseudomonas, a grampositivní bakterie, jako je Micrococcus nebo Bacillus. Mezi příklady eukaryotických organismů, z nichž lze získat karbonylovou hydrolasu a její geny, patří kvasinky, jako jsou Saccharomyces cerevisiae, plísně, jako je Aspergillus sp., a nelidské savčí zdroje, jako je například hovězí, z nichž lze získat gen kodující karbonylovou hydrolasu chymosin. Jako u subtilisinů, lze řady kabonylových hydrolas získat z různých příbuzných druhů, které mají aminokyselinové sekvence ne zcela homologní se členy oněch serií, ale které nicméně vykazují stejný nebo podobný typ biologické aktivity. Tak zde používaná nelidská karbonylová hydrolasa má funkční definici, která znamená karbonylové hydrolasy, které přímo nebo nepřímo souvisejí s prokaryotickými nebo eukaryotickými zdroji.

"Varianta karbonylové hydrolasy" má aminokyselinovou sekvenci odvozenou od aminokyselinové sekvence "prekursorové karbonylové hydrolasy". Tyto prekursorové karbonylové hydrolasy (jako je subtilisin) zahrnují přirozeně se vyskytující karbonylové hydrolasy (subtilisin) a rekombinantní karbonylové hydrolasy (subtilisin). Aminokyselinová sekvence varianty karbonylové hydrolasy je "odvozena" od aminokyselinové sekvence prekursorové hydrolasy substitucí, delecí nebo insercí jedné nebo více aminokyselin prekursorové aminokyselinové sekvence. Taková modifikace je "prekursorová DNA sekvence", která koduje aminokyselinovou sekvenci prekursorové karbonylové hydrolasy (subtilisinu) spíše než manipulace enzymu prekursorové karbonylové hydrolasy (subtilisinu) samotného. Mezi vhodné způsoby takové manipulace sekvence prekursorové DNA patří způsoby, které jsou zde popsány, stejně jako způsoby známé odborníkům z oblasti techniky (viz například evropský patent 0 328 199, WO 89/06279 a USA patenty a přihlášky již zde citované).

Pro mutace jsou vhodné specifické zbytky odpovídající po-

loze +76 v kombinaci s jednou nebo více z následujících poloh +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 a/nebo +274 Bacillus amyloliquefaciens subtilisina. Modifikované zbytky jsou s výhodou vybrány z následujících kombinací: 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 a nebo 76/103/104/222, nejvýhodnější jsou 76/99, 76/104, 76/99/10, 76/103/104, 76/104/107, 76/101/103/104, 76/99/101/103/104 a 76/101/104. Na tato čísla poloh aminokyselin se zde odkazuje jako na čísla sekvence maturovaného Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu uvedeného na obrázku 1. Proteasové enzymy užitečné podle předloženého vynálezu však nejsou omezeny na mutaci tohoto zvláštního subtilisinu, ale jsou rozšířeny na prekursorové karbonylové hydrolasy obsahující zbytky aminokyselin v polohách, které jsou "ekvivalentní" příslušným identifikovaným zbytkům v Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu. Prekursorový subtilisin s výhodou znamená Bacillus lentus subtilisin. Substituce, delece nebo inserce se provádějí na stejných zbytcích aminokyselin v B. lentus, které odpovídají shora uvedenému seznamu.

Zbytek (aminokyselina) prekursorové karbonylové hydrolasy je stejný jako zbytek Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu, jestliže buď je homologní (tj. odpovídající polohou buď primární nebo terciární struktuře) nebo analogický specifickému zbytku nebo části tohoto zbytku v Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu (tj. má stejnou nebo podobnou funkční kapacitu kombinovat, reagovat nebo vzájemně chemicky působit).

Pro zajištění homologie primární struktury se aminokyseli-

nová sekvence prekursorové karbonylové hydrolasy přímo srovnává s primární sekvenví Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu a zvláště s řadou zbytků, o nichž je známo, že v subtilisinu, pro který je známa sekvence, jsou invariantní. Obrázek 2 ukazuje zachované zbytky mezi amyloliquefaciens subtilisinem a B. lentus subtilisinem. Po seřazení zachovaných zbytků, umožnění nutných insercí a delecí, aby se zachovalo seřazení (tj. vyhnutí se eliminaci zachovaných zbytků delecí a insercí), jsou definovány zbytky odpovídající příslušným aminokyselinám v primární sekvenci Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu. Seřazení zachovaných zbytků by mělo s výhodou zachovat 100 % těchto zbytků. Avšak i seřazení větší než 75 % nebo tak malé jako 50 % zachovaných zbytků je také adekvátní pro definování ekvivalentních zbytků. Zachování katalytické triady Asp32/His64/Ser221 by mělo být uchováno.

Například na obrázku 3 jsou seřazeny sekvence aminokyselin subtilisinu z Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis (carlsbergensis) a Bacillus lentus tak, aby došlo k maximální homologii mezi sekvencemi aminokyselin. Srovnání těchto sekvencí ukazuje, že v každé sekvenci existují četné zachované zbytky. Tyto zachované zbytky (jako mezi BPN' a B.lentus) jsou uvedeny na obrázku 2.

Zachované zbytky se tedy mohou použít pro definování odpovídajících ekvivalentních zbytků aminokyselin Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu v jiných karbonylových hydrolasách, jako je subtilisin z Bacillus lentus (PCT spis č. WO 89/06279, publikovaný 13. července 1989), výhodný enzym subtilisinového prekursoru podle vynálezu nebo subtilisin označovaný PB92 (evropský patent 0 328 299), který je vysoce homologní s výhodným Bacillus lentus subtilisinem. Sekvence aminokyselin některých těchto subtilisinů jsou seřazeny na obrázcích 3A a 3B se sekvencí Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu tak, aby se dosáhla maximální homologie zachovaných zbytků. Jak lze vidět, v sekvenci Bacillus lentus existují četné delece při srovnání s Bacillus amyloliquefaciens subtilisinem. Tak například ekviva-

lentní aminokyselinou pro Val165 v Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu je u jiných subtilisinů isoleucin pro B. lentus a B. licheniformis.

Tak například aminokyselina v poloze +76 znamená asparagin (N) jak u B. amyloliquefaciens tak u B. lentus subtilisinu. Ve výhodné variantě subtilisinu podle vynálezu je však aminokyselina ekvivalentní poloze +76 Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu substituována aspartátem (D). Srovnání všech zbytků aminokyselin identifikovaných v tomto vynálezu pro substituci a výhodné substituce pro každou polohu jsou pro ilustraci uvedeny v tabulce II.

Tabulka II

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
B. amyloliquefaciens (přírodní	N	D	S	Q	Y	I	N
B. lentus (přírodní)	N	S	S	S	V	I	N
nejvýhodnější substituce	D	D	R	A	I/Y	V	S

Ekvivalentní zbytky mohou být definovány také stanovením homologie na úrovni terciární struktury prekursorové karbonylové hydrolasy, jejíž terciární struktura byla stanovena rentgenovou krystalografií. Ekvivalentní zbytky jsou definovány jako takové zbytky, u nichž atomové souřadnice dvou nebo více hlavních řetězců atomů příslušného zbytku aminokyseliny prekusorové karbonylové hydrolasy a Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu (N na N, CA na CA, C na C a O na O) jsou do 0,13 nm a s výhodou 0,1 nm po uspořádání. Uspořádání se dosáhne tím, že se nejlepší model orientuje a umístí se tak, aby poskytl maximální překryv atomových souřadnic nevodíkových proteinových atomů příslušné karbonylové hydrolasy vzhledem k Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu. Nejlepší model je takový krystalografický model, který dává nejnižší faktor R pro experimentální difrakční data

při nejvyšším dostupném rozlišení.

$$R \text{ faktor} = \Sigma_h |Fo(h)| - |Fc(h)| / \Sigma_h |Fo(h)|$$

Ekvivalentní zbytky, které jsou funkčně analogické specifickému zbytku Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu, jsou definovány jako takové aminokyseliny prekursorových karbonylových hydrolas, které mohou přijmout takovou konformaci, že buď mění, modifikují nebo přispívají k proteinové struktuře, navázání substrátu nebo katalýze definovaným způsobem a jsou přisuzovány specifickému zbytku Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu. Dále jsou to takové zbytky prekursorové karbonylové hydrolasy (pro kterou byla terciární struktura získána z rentgenových dat), které zaujímají analogickou polohu v tom rozsahu že, i když hlavní řetězce atomů daného zbytku nemusí uspokojovat kriteria ekvivalence na základě zaujetí homologní polohy, atomové souřadnice alespoň dvou atomů vedlejšího řetězce zbytku leží do 0,13 nm od odpovídajících atomů vedlejšího řetězce Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu. Souřadnice trojrozměrné struktury Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu je uvedena ve spisu Evropského patentového úřadu č. 0 251 446 (ekvivalentního USA patentové přihlášce SN 08/212 291, jejíž popis je zde zahrnut jako citace) a může být použit, jak shora uvedeno, ke stanovení ekvivalentních zbytků na úrovni terciární struktury.

Některé zbytky identifikované pro substituci, inserci nebo deleci, jsou zachované zbytky, zatímco některé nikoliv. V případě zbytků, které nejsou zachovány, je náhrada jedné nebo více aminokyselin omezena na substituce, které poskytují variantu, která má takovou sekvenci aminokyselin, která neodpovídá sekvenci nacházející se v přírodě. V případě zachovaných zbytků by taková náhrada neměla vést k přirozeně se vyskytující sekvenci. Varianty karbonylové hydrolasy použitelné v předloženém vynálezu zahrnují maturované formy variant karbonylové hydrolasy stejně jako pro- a prepro-formy těchto variant hydrolasy. Prepro-formy jsou výhodnou konstrukcí, jelikož usnadňují expresi, sekreci a maturaci variant karbonylové hydrolasy.

"Prosekvence" znamená sekvenci aminokyselin navázaných na N-konec maturované formy karbonylové hydrolasy, která po odstranění vede k "maturované" formě karbonylové hydrolasy. V přírodě se mnoho proteolytických enzymů vyskytuje jako translační proenzymové produkty. V nepřítomnosti posttranslačního opracování dochází k jejich exprimaci v tomto stavu. Výhodnou prosekvencí pro výrobu variant karbonylové hydrolasy, zvláště subtilisinových variant, je domnělá prosekvence Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu, i když se mohou použít i jiné prosekvence subtilisinu. V příkladech se používá domnělá prosekvence subtilisinu z Bacillus lentus (ATCC 21536).

"Signální sekvence" nebo "prosekvence" znamená jakoukoliv sekvenci aminokyselin navázanou na N-koncovou část karbonylové hydrolasy nebo na N-koncovou část prohydrolasy, která může participovat při sekreci maturované nebo pro-formy hydrolasy. Tato definice signální sekvence je funkční a to znamená, že zahrnuje všechny ty sekvence aminokyselin, které jsou kodovány N-koncovou částí genu subtilisinu nebo jiných sekretovaných karbonylových hydrolas, které se účastní uskutečnění sekrece subtilisinu nebo jiných karbonylových hydrolas za přírodních podmínek. Proteasové enzymy užitečné pro předložený vynález využívají tyto sekvence pro uskutečnění sekrece variant karbonylové hydrolasy, jak je to zde popsáno. Výhodná signální sekvence použitá v příkladech obsahuje prvních sedm zbytků aminokyselin signální sekvence z Bacillus subtilis subtilisinu napojených na zbytek signální sekvence substilisinu z Bacillus lentus (ATCC 21536).

"Prepro-" forma varianta karbonylové hydrolasy sestává z maturované formy hydrolasy, která má prosekvenci odštěpitelně napojenou na aminový konec hydrolasy a "pre" nebo "signální" sekvenci odštěpitelně napojitelnou na aminový konec prosekvence.

"Expresní vektor" znamená takovou DNA konstrukci obsahující sekvenci DNA, která je odštěpitelně napojena na vhodnou kontrolní sekvenci schopnou uskutečnit expresi uvedené DNA ve

vhodném hostiteli. Mezi tyto kontrolní sekvence patří promotor pro uskutečnění transkripce, případná operátorová sekvence pro regulaci takové transkripce, sekvence kodující vhodná mRNA ribosomová vazebná místa a sekvence, které regulují ukončení transkripce a translace. Vektor může znamenat plasmid, fágovou částici nebo jednoduše potenciální genomový insert. Jakmile je jednou transformován do vhodného hostitele, vektor může replikovat a fungovat nezávisle na hostitelském genomu nebo může, v některých případech, integrovat do samotného genomu. V této přihlášce jsou pojmy "plasmid" a "vektor" někdy používány vzájemně zaměnitelně, jelikož plasmid je dnes nejobvykleji používanou formou vektoru. Jsou sem však zahrnuty takové jiné formy expresních vektorů, které slouží jako ekvivalentní funkce a které jsou známy odborníkům z oblasti techniky.

"Hostitelskými buňkami" používanými podle předloženého vynálezu jsou obvykle prokaryotičtí nebo eukaryotičtí hostitelé, kteří jsou s výhodou manipulováni způsoby popsanými v USA patentu č. 4 760 025 (RE 34 606) a nejsou tedy schopni sekretovat enzymaticky aktivní endoproteasu. Výhodnou hostitelskou buňkou pro expresi subtilisinu je Bacillus kmen BG2036, který je deficitní na enzymaticky aktivní neutrální proteasu a alkalickou proteasu (subtilisin). Konstrukce kmene BG2036 je podrobně popsána v USA patentu 5 264 366. Mezi další hostitelské buňky pro exprimování subtilisinu patří Bacillus subtilis I168 (také popsaný v USA patentu č. 4 760 025 (RE 34 606) a v USA patentu č. 5 264 366, jejichž popisy jsou zde zahrnuty jako odkaz), stejně jako jakýkoliv vhodný kmen Bacillus, jako je B. licheniformis, B. lentus atd.

Hostitelské buňky jsou trasformovány nebo transfektovány vektory zkonstruovanými technikami rekombinantní DNA. Takové transformované hostitelské buňky jsou schopny buď replikovat vektory kodující varianty karbonylové hydrolasy nebo exprimovat žádanou variantu karbonylové hydrolasy. V případě vektorů, které kodují pre- nebo prepro-formu varianty karbonylové hydrolasy, jsou tyto varianty, jestliže jsou exprimovány, typicky se-

kretovány z hostitelské buňky do media hostitelské buňky.

Pojem "odštěpitelně napojen", jestliže tento pojem popisuje vzájemný vztah mezi DNA oblastmi, jednoduše znamená, že jsou funkčně spolu spojeny. Například presekvence je odštěpitelně napojena na peptid, jestliže funguje jako signální sekvence účastnící se sekrece maturované formy proteinu nejpravděpodobněji zahrnující štěpení signální sekvence. Promotor je odštěpitelně napojen na kodující sekvenci, jestliže reguluje transkripci sekvence. Ribosomové vazebné místo je odštěpitelně napojeno na kodující sekvenci, jestliže je umístěno tak, aby umožňovalo translaci.

Geny kodující přirozeně se vyskytující prekursorovou karbonylovou hydrolasu lze získat podle obecných způsobů známých odborníkům z oblasti techniky. Tyto způsoby obecně zahrnují syntetizování značených sond s domnělými sekvencemi kodujícími oblasti hydrolasy, o kterou se jedná, přípravu genomových knihoven z organismů exprimujících hydrolasu a prohledávání knihoven na gen, o který se jedná, hybridizací sond. Positivně hybridizované klony se pak mapují a sekvenují. B.lentus gen použitý v příkladech se klonuje, jak je popsáno v příkladu 1 USA patentu č. 5 185 258, jehož popis je zde zahrnut. BPN' gen použitý v příkladech se klonuje jak popsáno v příkladu 1 v RE č. 34 606, jehož popis je zde zahrnut.

Klonovaná karbonylová hydrolasa se pak používá pro transformování hostitelské buňky, aby došlo k expresi hydrolasy. Gen hydrolasy se pak liguje do plasmidu s vysokým počtem kopií. Plasmid replikuje v hostitelích v tom smyslu, že obsahuje dobře známé prvky nutné pro replikaci plasmidu: promotor odštěpitelně napojený na gen, o který se jedná (který může být dodáván jako vlastní homologní promotor genu, jestliže je rozpoznáván, tj. transkribovaán hostitelem), terminaci transkripce a polyadenylační oblast (nutnou pro stabilitu mRNA transkribované hostitelem z genu hydrolasy v některých eukaryotických hostitelských buňkách), která je exogenní nebo je dodávána endogenní termi-

načních oblastí genu hydrolasy, a je žádoucí selekční gen, jako je gen antibotické resistence, který umožňuje kontinuální kultivační uchovávání hostitelských buněk infikovaných plasmidem růstem v mediu, které obsahuje antibiotika. Plasmidy s vysokým počtem kopií obsahují také počátek replikace pro hostitele, čímž umožňují aby se v cytoplasmě, bez chromosomového omezení, generovalo velké množství plasmidů. V rozsahu vynálezu je však integrovat násobné kopie hydrolasového genu do genomu hostitele. To je usnadněno prokaryotickými a eukaryotickými organismy, které jsou zvláště citlivé na homologní rekombinaci.

Geny použité v předložených příkladech jsou přírodní B. lentus gen a přírodní Bacillus amyloliquefaciens gen. Může se vyrábět také syntetický gen kodující přirozeně se vyskytující nebo mutovanou prekursorovou karbonylovou hydrolasu (subtilisin). Při tomto postupu se stanoví sekvence DNA a/nebo aminokyselin prekursorové hydrolasy (subtilisinu). Pak se syntetizují násobné, překrývající se jednovláknové fragmenty DNA, které po hybridizaci a ligaci poskytují syntetickou DNA kodující prekursorovou hydrolasu. Příklad konstrukce syntetického genu je uveden v příkladu 3 USA patentu 5 204 015, jehož popis je zde zahrnut jako citace.

Jakmile je jednou přirozeně se vyskytující nebo syntetický gen prekursorové karbonylové hydrolasy klonován, lze získat četné modifikace, kterými se zvýší použití genu po syntéze přirozeně se vyskytující prekursorové karbonylové hydrolasy. Mezi tyto modifikace patří výroba rekombinantní karbonylové hydrolasy podle toho, jak je to popsáno v USA patentu 4 760 025 (RE 34 606) a ve spisu Evropského patentového úřadu 0 251 446, a zde popsaná výroba variant karbonylové hydrolasy.

Následující způsob mutagenese kazety lze použít pro usnadnění konstrukce a identifikace variant karbonylové hydrolasy užitečných v předloženém vynálezu, i když se mohou použít i jiné způsoby včetně místně řízené mutagenese. Nejdříve se získá přirozeně se vyskytující gen kodující hydrolasu a celý nebo

zčásti se sekvenuje. Potom se tato sekvence skanuje na bod, v němž je žádoucí provést mutaci (deleci, inserci nebo substituci) jedné nebo více aminokyselin v kodovaném enzymu. Sekvence obklopující tento bod se vyhodnotí na přítomnost restrikčních míst pro nahrazení krátkého segmentu genu sestavou oligonukleotidů, které při expresi kodují různé mutanty. Tato restrikční místa znamenají s výhodou jedinečná místa uvnitř hydrolasového genu, takže se usnadní náhrada segmentu genu. Může se však použít jakékoliv vhodné restrikční místo, které není v hydrolasovém genu příliš hojné s tím, že se genové fragmenty, které se generují restrikčním štěpením, znovu uspořádají do patřičné sekvence. Jestliže restrikční místa nejsou umístěna ve vhodných vzdálenostech od vybraného bodu (od 10 do 15 nukleotidů), tato místa se generují substituováním nukleotidů v genu tak, že ani čtecí oblast ani kodované aminokyseliny nejsou v konečné konstrukci změněny. Mutace genu, pro změnu jeho sekvence tak, aby se potvrdila žádaná sekvence, se dosáhne rozšířením M13 primeru obecně známými způsoby. Úkol umístění vhodných obklopujících oblastí a vyhodnocení potřebných změn tak, aby se získaly sekvence dvou vhodných restrikčních míst, se provede rutinním využitím nadbytečného genetického kodu, mapováním genu restrikčními enzymy a velkým počtem různých restrikčních enzymů. Všimněte si, že jestliže je dostupné vhodné obklopující restrikční místo, shora uvedený způsob je potřeba provést pouze v souvislosti s obklopující oblastí, která neobsahuje toto místo.

Jakmile je jednou přirozeně se vyskytující DNA nebo syntetická DNA klonována, restrikční místa obklopující ty polohy, které mají být mutovány, se rozštěpí rozpoznávacími restrikčními enzymy a četné kazety s komplementárními oligonukleotidy na koncích se ligují do tohoto genu. Tímto způsobem se mutagenese zjednoduší, protože mohou být syntetizovány všechny oligonukleotidy tak, aby měly stejná restrikční místa. K vytvoření restrikčních míst nejsou nutné žádné syntetické linkery.

Proteolytická aktivita tak, jak je zde používána, je zde definována jako rychlost hydrolysy peptidových vazeb na mili-

gram aktivního enzymu. Pro měření proteolytické aktivity existuje mnoho dobře známých postupů (K.M.Kalisz: "Microbial Proteinases", Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter, red., 1988.). Vedle nich nebo jako alternativa k modifikované proteolytické aktivitě, mohou mít variantní enzymy podle předloženého vynálezu další modifikované vlastnosti, jako je K_m, K_{kat}, poměr K_{kat}/K_m a/nebo modifikovaná substrátová specifičnost a/nebo modifikovaný profil pH aktivity. Tyto enzymy mohou být upraveny pro příslušný substrát, o kterém se předpokládá, že bude přítomen, například v hydrolytickém procesu, jako je tomu při praní.

Jedním předmětem může být zajištění takové varianty karbonylové hydrolasy, která má změněnou proteolytickou aktivitu při srovnání s prekursorovou karbonylovou hydrolasou, jelikož zvýšení této aktivity (numericky větší) umožňuje použití enzymu k účinnějšímu působení na cílový substrát. Naším zájmem jsou také varianty enzymů, které mají změněnou tepelnou stabilitu a/nebo změněnou subtrátovou specifičnost při srovnání s prekursorem. Výhodnou karbonylovou hydrolasou, která má být mutována, je subtilisin. Specifické aminokyseliny, které jsou užitečné pro získání těchto výsledků v karbonylových hydrolasách subtilisinového typu, zbytků pro +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 a/nebo +274 nebo jakákoliv jejich kombinace v Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu jsou uvedeny v příkladech. V některých případech může být žádoucí nižší proteolytická aktivita. A naopak, v některých případech může být žádoucí zvýšit proteolytickou aktivitu varianty enzymu proti jeho prekursoru. Dále může být žádoucí zvýšení nebo snížení (změna) stability varianty, ať alkalické nebo tepelné. Zvýšení nebo snížení K_m, K_{kat} nebo K_{kat}/K_m jsou specifická pro substrát použitý pro stanovení těchto kinetických parametrů.

Bylo také ukázáno, že zbytky ekvivalentní +76 v kombinaci s četnými jinými modifikacemi v subtilisinu jsou důležité při

modulování celkové stability a/nebo proteolytické aktivity enzymu. Tak, jak je uvedeno v příkladech, asparagin (N) v Bacillus lentus subtilisinu v ekvivalentní poloze +76 může být substituován aspartátem (D) ve výhodných proteasových enzymech v kombinaci s modifikací jednoho nebo více následujících aminokyselinových zbytků: +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 a/nebo +274 pro získání zvýšené stability a/nebo zvýšené aktivity výsledného mutovaného enzymu.

Nejvýhodnější proteasové enzymy užitečné podle tohoto vynálezu jsou uvedeny v příkladech. Patří mezi ně následující specifické kombinace substituovaných zbytků: N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V a N76D/S101R/S103A/V104I. Tyto substituce se s výhodou provádějí v Bacillus lentus (rekombinantním nebo přírodním) subtilisinu, i když tyto substituce se mohou provádět v jakémkoliv Bacillus subtilisinu.

Na základě výsledků získaných s touto a dalšími variantami substilisinů je zřejmé, že zbytky v karbonylových hydrolasách (s výhodou substilisinu) ekvivalentní polohám +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 a/nebo +274 v Bacillus amyloliquefaciens jsou důležitými pro proteolytickou aktivitu, provedení a/nebo stabilitu těchto enzymů a pro postupy čištění nebo mytí pomocí těchto variantních enzymů.

Dále jsou uvedeny příklady výroby proteasových enzymů užitečných v prostředcích podle předloženého vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad výroby proteasy

Konstrukce pro expresi genu GG36 v B. subtilis

Klonování a konstrukce pro expresi genu subtilisinu z B. lentus se provádí v podstatě stejným způsobem, jako je to popsáno v USA patentu č. 5 185 258. Plasmid GGA274 (popsaný zde v příkladu 4) se dále modifikuje následujícím způsobem, jak je uvedeno na obrázku 5. PstI místo, které se zavede během konstrukce plasmidu GGA274, se odstraní níže popsanou oligonukleotidem řízenou mutagenesí oligonukletidem následující sekvence identifikační číslo 1

5′ GAAGCTGCAACTCGTTAAA 3′ (sekv. id. č. 1).

Podtržený zbytek A eliminuje rozpoznávací sekvenci restrikčního enzymu PstI a mění odpovídající zbytek aminokyseliny z alaninu na threonin v poloze 274. Threonin v poloze 274 je zbytek přírodního typu původně se nalézající v klonovaných sekvencích genu B. lentus subtilisinu. DNA segment kodující subtilisin se vyštípne z plasmidu GGA274 nebo jeho derivátů (GGT274 uvedeném na obrázku 5) štěpením EcoRI a BamHI. DNA fragment je subklonován zpět do vektorů na bázi bakteriofágu M-13, jako je MP19, pro mutagenesi. Po mutagenesi se provede štěpení EcoRI a HindIII s následujícím klonováním, aby se mutovaný gen subtilisinu přesunul zpět do expresního plasmidu, jako je GGA274, pro expresi a isolování mutovaných subtilisinových proteinů.

Oligonukleotidem řízená mutagenese

Oligonukleotidem řízená mutagenese se provádí podle Zollera M. a spol.: Methods Enzymol. 100, 468 (1983). Jako příklad, syntetický oligonukleotid sekvence identifikační číslo 2

5′ GCTGCTCTAGACAATTCG 3′ (sekv. id. č. 2)

se použije pro změnu zbytku aminokyseliny v poloze 76 z asparaginu (N) na kyselinu asparagovou (D) neboli N76D. Podtržené "G" a "C" zbytky označují změny proti sekvenci genu přírodního ty-

pu. CA zachovává leucin v poloze +75 a mění sekvenci aminokyselin zavedením XbaI rozpoznávacícho místa restrikčního enzymu XbaI (TCTAGA), zatímco změna na GAC mění asparagin v poloze +76 na aspartát.

Pro mutagenesi v polohách 99, 101, 103 a 104 se mohou používat různé oligonukleotidy podle kombiance žádaných mutací. Například oligonukleotid sekvence identifikační číslo 3

5′ GTATTAGGGGCGGACGGTCGAGGCGCCATCAGCTCGATT 3′ (sekv. id. č. 3)

se používá současně pro následující změny: S99D, S101R, S103A a V104I v jediné molekule subtilisinu. Podobně se používají oligonukleotidy sekvence identifikační číslo 4

5′ TCAGGTTCGGTCTCGAGCGTTGCCCAAGGATTG 3′ (sekv. id. č. 4)

a sekvence identifikační číslo 5

5′ CACGTTGCTAGCTTGAGTTTAG 3′ (sekv. id. č. 5)

pro generaci I107V, respektive N123S. Podtržené zbytky opět označují změny proti sekvencím přírodního typu, které poskytují žádané změny buď v sekvencích aminokyselin nebo rozpoznávacích sekvencích restrikčních enzymů.

Proteolytická aktivita variant subtilisinu

Podle způsobů shora uvedené oligonukleotidem řízené mutagenese se vyrobí varianty, jejichž seznam je uveden v tabulce III. Proteolytická aktivita každé této varianty subtilisinu je uvedena v tabulce III. Kinetické parametry k_{kat}, K_m a k_{kat}/K_m jsou měřeny pro hydrolýzu subtrátu syntetického peptidu sukcinyl-L--Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilidu způsobem popsaným P. Bonneauem a spol.: J. Amer. Chem. Soc. 113(3), 1030 (1991). Ve stručnosti - malý podíl zasobního roztoku varianty subtilisinu se přidá do 1cm kyvety obsahující substrát rozpuštěný v 0,1M Tris-HCl pufru, pH 8,6, a udržuje se na teplotě 25 °C v termostatu. Postup reakce se sleduje spektrofotometricky sledováním absorbance reakčního produktu p-nitroanilinu při 410 nm. Použitím nelineárního regresního algoritmu tak, aby reakční rychlost a koncentrace produktu každé reakce odpovídaly Michae-

lis-Mentenově reakci, se získají kinetické parametry.

Tabulka III

Kinetické parametry k_{kat}, K_m, nebo k_{kat}/K_m měřeny pro Bacillus lentus subtilisin a varianty

protea- sa č.	varianty enzymu	k_{kat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{kat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
-	B.lentus subtilisin	170	0,00078	$2,18.10^5$
-	N76D	219	0,0008	$2,74.10^5$
1	N76D/S99D	88	0,00061	$1,44.10^5$
2	N76D/S101R	371	0,0013	$2,85.10^5$
3	N76D/S103A	400	0,0014	$2,86.10^5$
4	N76D/V104I	459	0,0011	$4,17.10^5$
5	N76D/I107V	219	0,0011	$1,99.10^5$
6	N76D/N123S	115	0,0018	$6,40.10^4$
7	N76D/S99D/S101R	146	0,00038	$3,84.10^5$
8	N76D/S99D/S103A	157	0,0012	$1,31.10^5$
9	N76D/S99D/V104I	247	0,00097	$2,55.10^5$
10	N76D/S101R/S103A	405	0,00069	$5,90.10^5$
11	N76D/S101R/V104I	540	0,00049	$1,10.10^6$
12	N76D/S103A/V104I	832	0,0016	$5,20.10^5$
13	N76D/V104I/I107V	497	0,00045	$1,10.10^6$
14	N76D/V104Y/I107V	330	0,00017	$1,90.10^6$
15	N76D/V107I/N123S	251	0,0026	$9,65.10^4$
16	N76D/I107V/N123S	147	0,0035	$4,20.10^4$
17	N76D/S99D/S101R/S103A	242	0,00074	$3,27.10^5$
18	N76D/S99D/S101R/V104I	403	0,00072	$5,60.10^5$
19	N76D/S99D/S103A/V104I	420	0,0016	$2,62.10^5$
20	N76D/S101R/S103A/V104I	731	0,00065	$1,12.10^6$
21	N76D/S103A/V104I/N123S	321	0,0026	$1,23.10^5$
22	N76D/V104I/I107V/N123S	231	0,003	$7,70.10^4$
23	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0,00098	$6,37.10^5$
24	N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0,0043	$4,51.10^4$
25	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0,0023	$1,35.10^5$

Výsledky uvedené v tabulce III ukazují, že všechny testované varianty subtilisinu si zachovávají proteolytickou aktivitu. Podrobná analýza dat dále ukázala, že proteolytická aktivita je významně změněna u Bacillus lentus subtilisinu různými kombinacemi substitucí zbytků aminokyselin ekvivalentních polohám 76, 99, 101, 103, 104, 107 a 123 u Bacillus amyloliquefaciens.

Tepelná stabilita variant subtilisinu

Srovnání tepelné stability pozorované pro Bacillus lentus subtilisin a varianty podle předloženého vynálezu vyrobené způsobem shora uvedené oligonukleotidem řízené mutaganese je uvedeno v tabulce IV. Vyčištěný enzym, 15 μg/ml v),1M glycinu a 0,01% Tweenu 80, pH 10,0, s nebo bez 50mM $CaCl_2$, se rozdělí do malých zkumavek a inkubuje se 5 minut při 10 °C, 1 minutu při 10 až 60 °C a 20 minut při 60 °C. Zkumavky se pak na 10 minut dají do ledu. Podíly ze zkumavek se testují na aktivitu enzymu přidáním do 1cm kyvety obsahující 1,2 mM syntetického peptidového substrátu, sukcinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilidu, rozpuštěného v 0,1M Tris-HCl pufru, pH 8,6, udržovaným na 25 °C. Počáteční lineární reakční rychlost se sleduje spektrofotometricky sledováním absorbance reakčního produktu p-nitroanilinu při 410 nm jako funkce času. Data se uvádějí jako procento aktivity před zahřátím. Výsledky uvedené v tabulce IV ukazují, že převážná většina variant vykazuje tepelnou stabilitu srovnatelnou s Bacillus lentus subtilisinem (24 z 26) v testu s přidaným 50mM $CaCl_2$. V testu bez přidání 50mM $CaCl_2$ byla velká většina variant (19 z 26) významně stabilnější než Bacillus lentus subtilisin. Dále pak varianty N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/ /V104Y/I107V a N76D/S101R/S103A/V104I jsou významně stabilnější než jediná substituční varianta N76D v testu bez přidání 50mM $CaCl_2$.

Tabulka IV

Tepelná stabilita měřená pro Bacillus lentus subtilisin a varianty při pH 10, 60 °C, s přidáním nebo bez přidání +/- 50mM $CaCl_2$

enzym	% zbývající původní aktivity	
	- $CaCl_2$	+ $CaCl_2$
B. lentus subtilisin	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
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	100

Oligonukleotidem řízená mutagenese s templátem jednovláknové DNA generované z fagemidu

A. Konstrukce B. lentus variant

Postup mutagenese je v podstatě stejný jak shora popsáno při oligonukleotidem řízené mutagenesi. Templát jednovláknové DNA se generuje způsobem fagemidu. Pro zkonstruování fagemidového vektoru pro generaci templátu jednovláknové DNA se nejdříve zkonstruuje vektor pBCDAICAT. Nákres konstrukce vektoru je uveden na obrázku 8. Nejdříve se klonuje fragment ClaI-ClaI kodující CAT gen z plasmidu pC194 (Horinouchi A. a Weisblum B.: J. Bacteriol 150, 8 (1982).) do AccI místa polylinkerové oblasti pUC19 (New England BioLabs, Beverly, Ma.). Získá se plasmid pUCCHL a EcoRI-DraI fragment o 600 párech nukleotidů (p.n.) z 5' konce GG36DAI kodující DNA se klonuje do EcoRI a EcoRV míst plasmidu pBSKS (Stratagene, Inc., San Diego, Ka.). Získá se pBC2SK5. Jediné místo EcoRI plasmidu pBC2SK5 se odstraní štěpením EcoRI, následuje doplnění katalyzované T4 DNA polymerasou a religace za vzniku plasmidu pBC2SK-5R, který nemá místo EcoRI. EcoRI-DraI fragment, který se klonuje do pBCSK-5R, se isoluje jako PstI-HindIII fragment a klonuje se do místa PstI-HindIII plasmidu pUCCHL (část polylinkeru pUC19). Získá se plasmid pUCCHL5R. Kodující sekvence GG36DAI genu se vyštípne jako EcoRI-BamHI fragment a klonuje se do EcoRI-BamHI míst plasmidu pUCCHL5R za vzniku pUCCAT. Velký EcoRI-HindIII fragment pUCCAT se pak klonuje do EcoRI a HindIII míst BS2KS+. Získá se plasmid pBCDAICAT.

Pro generaci jednovláknové DNA se E.coli-obsahující plasmid pBCDAICAT infikuje fágem R408 (získaným od Stratagene, San Diego, Ka.) podle postupu popsaného Russelem M., Kiddem S. a Kelleym M.R.: Gene 45, 333 (1986). Jakmile je jednou templát jednovláknové DNA dostupný, provedou se standardní mutagenační způsoby tak, jak je to popsáno v oligonukleotidem řízené mutagenesi. Konstrukce některých mutantů je zde podrobně uvedena z ilustračních důvodů.

Při konstrukci B.lentus (GG36) N76D/S103A/V104I/L217H se EcoRI-BamHI DNA fragment kodující GG36 N76D/S103A/V104I použije pro konstrukci pUCCAT (viz obr. 8). Získá se plasmid pBCDAICAT. Po tom, co se podle shora popsaného postupu připraví templát jednovláknové DNA, se pro získání L217H použije primer mutagenese sekvence identifikační číslo 13

* *** **x ClaI

5′ TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3′

(sekv. id. č. 13).

Stejně jako před tím podtržené zbytky znamenají změny nukleotidů, ke kterým došlo, a x ClaI znamená, že existující ClaI místo je po mutagenesi odstraněno. Postup mutagenese je shora popsán v oligonukleotidem řízené mutagenesi. Po mutagenesi se plasmidová DNA nejdříve testuje na eliminaci ClaI místa a ty klony, kterým chybí ClaI místo, se podrobí analýze DNA sekvence pro ověření DNA sekvence, u které existuje změna L na H v poloze 217 zbytků aminokyselin.

B. Konstrukce BPN′ variant a jejich exprese v B. subtilis

Konstrukce Bacillus amyloliquefaciens (BPN′) N76D/Q103A/ /Y104I/Y217L se provádí podobným způsobem až na dva následující stupně. N76D se nejdříve zavede do BPN′ Y217L. Získá se BPN′ N76D/Y217L. Druhou mutagenesí se převede BPN′ N76D/Y217L na BPN′ N76D/Q103A/Y104I/Y217L. Pro získání templátu jednovláknové DNA pro první mutagenesi se EcoRI-BamHI fragment kodující BPN′ Y217L subtilisin (odvozený od plasmidu Y217L popsaného Wellsem J. a spol.: PNAS 84, 5167, 1087) použije pro zkonstruování plasmidu pUCCATFNA (viz obr. 9). Plasmid pUCCATFNA obsahující BPN′ Y217L se použije pro zkonstruování pBCFNACAT plasmidu (obr. 9). Jednovláknová DNA se generuje jak shora popsáno. Pro získání BPN′ N76D/Y217L se oligonukleotidový primer sekvence identifikační číslo

* *** ** XbaI

5′ C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3′

(sekv. id. č. 14)

použije pro generaci změny N76D. Potom se připraví jednovlákno-

vá DNA z plasmidu pBCFNACAT obsahujícího BPN' N76D/Y217L (plasmid pBCFNACAT po mutagenesi N76D) a mutagenizuje se jiným oligonukleotidem sekvence identifikační číslo 15

* *** **x PvuII

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

(sekv. id. č. 15),

čímž se získá BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L. Všechny stupně včetně klonování, přípravy jednovláknové DNA, mutagenese a testování mutantů se provádějjak shora popsáno. Exprese genu BPN' a jeho variant se dosáhne integrováním plasmidové DNA (pBCFNACAT obsahující různé varianty genu BPN') přímo do kmenu Bacillus subtilis deficitního na proteasu, jak je popsáno v RE 34 606.

Podle těchto příkladů výroby proteas se mohou vyrobit četné varianty. Pro tyto varianty byla stanovena kinetická data a data stability. Kinetická data se získají shora popsanými způsoby a jsou uvedena v tabulce V. Data stability se získávají jak zde uvedeno. Výsledky jsou uvedeny v tabulce VI.

Postup testování tepelné stability

Vyčištěný enzym se podrobí výměně s pufrem v 0,1M glycinu, pH 10,00, 0,01% Tween-80, nanesením tohoto enzymu na kolonu se Sephadexem G-25, ekvilibrovanou tímto pufrem, a eluováním enzymu z kolony stejným pufrem.

Do zkumavky obsahující 0,1M glycin, 0,01% Tween-80, pH 10,0, udržovaný v termostatu na 60 °C, se přidá enzym na konečnou koncentraci 15 μg/ml.

Z inkubace při 60 °C se v různých dobách odebírají jednotlivé podíly bezprostředně se testují na enzymovou aktivitu přidáním do 1cm kyvety obsahující 1,2mM syntetický peptidový substrát, sukcinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid, rozpuštěný v 0,1M Tris-HCl pufru, pH 8,6, udržovaný na 25 °C. Počáteční lineární reakční rychlost se sleduje fotometricky sledováním absorbance reakčního produktu p-nitroanilinu při 410 nm

jako funkce času.

Poločas, který znamená délku doby, která je potřeba pro deaktivaci 50 % hmotn. enzymu, se stanovuje z reakční rychlosti prvního řádu jako funkce doby inkubace při 60 °C.

Tato data jsou uvedena v tabulce VI jako procenta poločasu stanovená pro Bacillus lentus subtilisin (GG36) za stejných podmínek.

Tabulka V

enzym	k_{kat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{kat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
B.lentus subtilisin	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
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

Tabulka V (pokračování)

enzym	k_{kat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{kat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
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 subtilisin (BPN')	50	0,14	3,60E+05

Tabulka V (dokončení)

enzym	k_{kat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{kat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
BPN'-N76D/Y217L*	380	0,46	8,30E+05

* Tyto mutanty byly připraveny oligonukleotidem řízenou mutagenesí s templátem jednovláknové DNA generované z fagemidu, všechny ostatní shora uvedenou oligonukleotidem řízenou mutagenesí.

Tabulka VI

enzym	tepelná stabilita (% poločasu přírodního enzymu)
B.lentus subtilisin	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

Tabulka VI (pokračování)

enzym	tepelná stabilita (% poločasu přírodního enzymu)
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
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

Tabulka VI (dokončení)

enzym	tepelná stabilita (% poločasu přírodního enzymu)
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
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	240
B. amyloliquefaciens subtilisin (BPN')	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

* Tyto mutanty byly připraveny oligonukleotidem řízenou mutagenesí s templátem jednovláknové DNA generované z fa-

gemidu, všechny ostatní shora uvedenou oligonukleotidem řízenou mutagenesí.

2. Materiály čistících prostředků

Čistící prostředky podle předloženého vynálezu obsahují také, vedle shora popsaného bělícího činidla a proteasového enzymu, jeden nebo více materiálů čistícího prostředku slučitelných s proteasovým enzymem. Pojem "materiály čistícího prostředku" tak, jak se zde používá, znamená jakýkoliv kapalný, pevný nebo plynný materiál vybraný pro příslušný typ žádaného čistícího prostředku a formy produktu (např. kapalný prostředek, prostředek v granulích, ve spreji), při čemž tyto materiály jsou také slučitelné s proteasovým enzymem použitým v prostředku. Specifický výběr materiálů čistícího prostředku se snadno provede tak, že se vezme v úvahu povrch, položka nebo látka, která má být čištěna, a žádaná forma prostředku pro podmínky čištění během použití (např. během použití detergentu pro mytí). Pojem "slučitelný" tak, jak se zde používá, znamená, že materiály čistících prostředků nesnižují proteolytickou aktivitu proteasového enzymu do takové rozsahu, aby proteasa nebyla účinná během normálního použití tak, jak je žádoucí. Dále jsou zde podrobně uvedeny specifické materiály čistících prostředků.

V prostředcích pro čištění rozmanitých povrchů, kdy je potřeba odstranit proteinové skvrny, je zahrnuto efektivní množství jednoho nebo více shora popsaných proteasových enzymů. Mezi tyto čistící prostředky patří detergentní prostředky pro čištění tvrdých povrchů neomezené formou (např. kapalné nebo granulované), detergentní prostředky pro čištění látek neomezené formou (např. granulované, kapalné nebo ve formě kostek), prostředky pro mytí nádobí (neomezené formou), orální čistící prostředky neomezené formou (např. zubní prášek, zubní pasta a ústní voda) a čistící prostředky zubních protéz neomezené formou (např. kapalné, tablety). Pojem "efektivní množství proteasového enzymu" tak, jak se zde tento pojem používá, znamená takové množství shora popsaného proteasového enzymu, které je

nutné pro dosažení enzymatické aktivity pro specifický čistící prostředek. Takové efektivní množství snadno odhadne odborník z oblasti techniky a je dáno mnoha faktory, jako je příslušná použitá varianta enzymu, čistící aplikace, specifické složení čistícího prostředku, na tom, jestli je žádoucí kapalný nebo suchý (např. granulovaný, kostka) prostředek a podobně.

Čistící prostředky podle předloženého vynálezu s výhodou obsahují od 0,0001 % hmotn. do 10 % hmotn. jednoho nebo více proteasových enzymů, výhodněji od 0,001 do 1 % hmotn., ještě výhodněji od 0,001 do 0,1 % hmotn. Je také výhodné, jestliže je proteasový enzym přítomen v prostředcích v takovém množství, které je dostatečné pro zajištění poměru mg aktivní proteasy na 100 g prostředku na ppm teoreticky dostupného O_2 ("AvO_2") z perkyseliny v prací vodě, označovaný zde jako poměr enzymu k bělícímu činidlu (poměr E/B), v rozmezí od 1:1 do 20:1. Některé příklady různých čistících prostředků, v nichž se mohou používat proteasové enzymy, jsou podrobněji diskutovány níže. Všechny díly, procenta a poměry, které jsou zde používány, jsou hmotnostní, pokud není uvedeno jinak.

Prostředky a způsoby podle vynálezu jsou vedle specifických proteasových enzymů účinné podle všech způsobů čistících enzymů. Případné čistící enzymy užitečné podle předloženého vynálezu se mohou zahrnout do prostředků pro praní látek, včetně odstranění skvrn na bázi proteinů, na bázi sacharidů nebo a bázi triglyceridů a například pro zabránění přenosu nestálých barviv. Mezi enzymy, které se do prostředku zahrnují, patří proteasy, amylasy, lipasy, celulasy a peroxidasy, stejně jako jejich směsi. Do prostředků mohou být zahrnuty také jiné typy enzymů. Mohou být jakéhokoliv vhodného původu, jako je rostlinný, živočišný, bakteriální, plísňový a kvasinkový. Jejich výběr je však dán několika faktory, jako je pH aktivita a/nebo optimální stabilita, tepelná stabilita, stabilita vůči aktivním detergentním činidlům, stavebním složkám atd. V tomto ohledu jsou výhodnými bakteriální nebo plísňové enzymy, jako jsou bakteriální amylasy a proteasy a plísňové celulasy.

Enzymy jsou v prostředcích obvykle obsaženy v dostatečných množstvích a to až 50 mg, typičtěji 0,01 mg až 10 mg aktivního enzymu na gram detergentního prostředku. Jinak řečeno, efektivním množstvím případných enzymů používaných podle předloženého vynálezu je typicky alespoň 0,001, s výhodou 0,001 až 5, výhodněji 0,001 až 1 a nejvýhodněji 0,01 až 1 % hmotn. z hmotnosti detergentního prostředku.

Vhodnými příklady případných proteas jsou subtilisiny, které se získávají z příslušných kmenů B. subtilis nebo B. licheniformis. Jinou vhodnou proteasou je modifikovaný enzym bakteriální serinová proteasa získaná z Bacillus subtilis nebo Bacillus licheniformis, která má maximální aktivitu při pH v rozmezí od 8 do 12, vyvinutá a prodávaná Novo Industries A/S pod obchodním označením Esperase. Příprava tohoto a podobných enzymů je popsána v britské patentové přihlášce č. 1 243 784 firmy Novo. Mezi další proteolytické enzymy, které jsou komerčně dostupné, patří proteasy prodávané po obchodními názvy Alcalase a Savinase od Novo Industries A/S (Dánsko) a Maxatase od International Bio-Synthetics, Inc. (Holandsko). Mezi další proteasy patří Proteasa A (viz evropská patentová přihláška č. 130 756, publikovaná 9. ledna 1985), Proteasa B (viz evropská patentová přihláška č. 87303761.8, podaná 28. dubna 1987, a evropská patentová přihláška 130 756 Botta a spol., publikovaná 9. ledna 1985) a Proteasa C, která je trojitou variantou alkalické serinové proteasy z Bacillus, v níž tyrosin nahradil valin v poloze 104, serin nahradil asparagin v poloze 123 a alanin nahradil threonin v poloze 274. Proteasa C je popsána v evropském spisu 90915958.4, odpovídajícím WO 91/06637, publikovaném 16. května 1991, který je zde zahrnut jako odkaz. Patří sem také geneticky modifikované varianty, zvláště proteasa C.

Mezi amylasy patří například a-amylasy popsané v britském patentovém spisu 1 296 839 (Novo), Rapidase, International Bio-Synthetics, Inc., a Termamyl, Novo Industries.

Mezi celulasy použitelné v předloženém vynálezu patří jak

bakteriální tak plísňové celulasy. Jejich optimální pH je s výhodou mezi 5 a 9,5. Vhodné celulasy jsou popsány v USA patentu 4 435 307 Barbesgoarda a spol., vydaném 6. března 1984, který popisuje plísňovou celulasu produkovanou Humicola insolens a Humicola kmenem DSM1800 nebo celulasu 212 produkovanou plísní, která patří k rodu Aeromonas, a celulasu extrahovanou z hepatopankreasu Dolabella Auricula Solander. Vhodné celulasy jsou popsány také v britské patentové přihlášce A 2 075 028, v britské patentové přihlášce A 2 095 275 a v SRN spisu 2 247 832.

Mezi vhodné lipasové enzymy pro použití v detergentním prostředku patří enzymy produkované mikroorganismy skupiny Pseudomonas, jako je Pseudomonas stutzeri ATCC 1(.154, popsaný v britském patentu 1 372 034. Viz také lipasy v japonské patentové přihlášce 53-20487, vyložené k veřejné prohlídce 24. února 1978. Tato lipasa je dostupná od Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japonsko, pod obchodním označením Lipasa P "Amano", která je zde dále označována jako "Amano-P". Mezi další komerční lipasy patří Amano-CES, lipasy extrahované z Chromobacter viscosum, např. Chromobacter viscosum var. lipolyticum NRRLB 3673, komerčně dostupná od Toyo Jozo Co., Tagata, Japonsko, další Chromobacter viscosum lipasy od U.S. Biochemical Corp., USA, a Diosynth Co., Holandsko, a lipasy z Pseudomonas gladioli. Výhodnou lipasou pro použití podle vynálezu je enzym Lipolase, odvozený od plísně Humicola lanuginosa, exprimovaný v Aspergillus oryzae jako hostiteli a komerčně dostupný od Novo (viz také evropský patent 341 947).

Peroxidasové enzymy se používají v kombinaci se zdroji kyslíku, např. peruhličitanem, perboritanem, persíranem, peroxidem vodíku atd. Používají se jako "bělící roztok", tj. pro zabránění přenosu barviv nebo pigmentů odstraněných ze substrátů během praní na jiné substráty v pracím roztoku. Peroxidasové enzymy jsou známy odborníkům z oblasti techniky. Patří mezi ně například křenová peroxidasa, ligninasa a halogenperoxidasa, jako je chlor- a brom-peroxidasa. Detergentní prostředky obsahující peroxidasu jsou popsány například v mezinárodní

přihlášce PCT WO 89/099813, publikované 19. října 1989 O. Kirkem, firmy Novo Industries A/S.

Rozmanité enzymové materiály a prostředky pro jejich zahrnutí do syntetických detergentních granulí jsou popsány také v USA patentu 3 553 139, vydaném 5. ledna 1971, McCartyho a spol. Enzymy jsou dále popsány v USA patentu 4 101 457 Placeho a spol., vydaném 18. července 1978, a v USA patentu 4 507 219 Hughese, vydaném 26. března 1985. Enzymové materiály užitečné pro kapalné detergentní prostředky a jejich zahrnutí do těchto prostředků je popsáno v USA patentu 4 261 868 Hory a spol., vydaném 14. dubna 1981. Enzymy pro použití v detergentních prostředcích se mohou stabilizovat různými způsoby. Způsoby stabilizování enzymů jsou popsány například v USA patentu 4 261 868, vydaném 14. dubna 1981, Horna a spol., USA patentu 3 600 319, vydaném 17. srpna 1971, Gedgeho a spol., a v evropské patentové přihlášce 0199405, přihlášce č. 86200586.5 Venegase, publikované 29. října 1986,. Systémy pro stabilizaci enzymů jsou také popsány například v USA patentech číslo 4 261 868, 3 600 319 a 3 519 570.

Enzymy, které se používají podle tohoto vynálezu, se mohou v konečných prostředcích stabilizovat přítomností ve vodě rozpustných zdrojů vápenatých iontů, které dodávají enzymům vápenaté ionty. Další stabilizace se může dosáhnout přítomností různých jiných v oblasti techniky popsaných stabilizátorů, zvláště boritanových částí: viz Severson: USA patent 4 537 706, který je uveden shora. Typické detergentní prostředky, zvláště kapaliny, budou obsahovat od 1 do 30, s výhodou od 2 do 20, výhodněji od 5 do 15 a nejvýhodněji od 8 do 12 milimolů vápenatých iontů na litr konečného prostředku. Toto množství se může poněkud měnit podle přítomného množství enzymu a podle odpovědi na vápenaté ionty. Množství vápenatých iontů by mělo být vybráno tak, že v prostředku neustále existuje nějaké minimální množství dostupné pro enzym po komplexaci se stavebními složkami, mastnými kyselinami atd. Jako zdroj vápenatých iontů se může používat jakákoliv ve vodě rozpustná vápenatá sůl včetně,

ale bez omezení jenom na ně, chloridu vápenatého, síranu vápenatého, jablečnanu vápenatého, hydroxidu vápenatého, mravenčanu vápenatého a octanu vápenatého. V prostředku jsou často přítomna také malá množství vápenatých iontů, obvykle mezi 0,05 a 0,4 milimoly na litr, díky vápníku přítomnému v enzymové suspenzi a ve vodě použité pro přípravu. V připravených pevných detergentních prostředcích je obsaženo dostatečné množství zdroje ve vodě rozpustných vápenatých iontů tak, aby bylo zajištěno dostatečné množství v prací vodě. Jinak může postačovat tvrdost přírodní vody.

Prostředky podle vynálezu mohou popřípadě, ale s výhodou, obsahovat různé další stabilizátory včetně křemičitanových potahů a zvláště stablizátorů typu boritanů. Tyto stabilizátory se v prostředcích typicky používají v množstvích od 0,25 do 10, s výhodou od 0,5 do 5, výhodněji od 0,75 do 3 % hmotn. kyseliny borité nebo jiné boritanové sloučeniny schopné tvořit v prostředku kyselinu boritou (vztaženo na kyselinu boritou). Kyselina boritá je výhodná, i když vhodnými jsou také jiné sloučeniny, jako je oxid boritý, borax a další boritany alkalických kovů (např. ortho-, meta- a pyroboritan sodný a pentaboritan sodný. Místo kyseliny borité se mohou použít také substituované kyseliny borité (např. fenylboritá kyselina, butanboritá kyselina a p-bromfenylboritá kyselina).

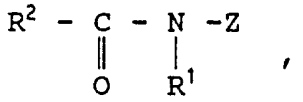
Množství čístícího povrchově aktivního činidla, které je obsaženo v připravených detergentních prostředcích podle předloženého vynálezu, může být od 1 do 99,8 % hmotn. podle příslušných povrchově aktivních činidel a podle žádoucích účinků. Čistící povrchově aktivní činidla s výhodou obsahují od 5 do 80 % hmotn. detergentních složek.

Čistící povrchově aktivní činidlo může být neiontové, aniontové, amfolytické, obojetné nebo kationtové. Mohou se používat také směsi těchto povrchově aktivních činidel. Výhodné detergentní prostředky zahrnují aniontová čistící povrchově aktivní činidla nebo směsi aniontových povrchově aktivních čini-

del s jinými povrchově aktivními činidly, zvláště neiontovými povrchově aktivními činidly.

Mezi neomezující příklady povrchově aktivních činidel, která jsou zde použitelná, patří konvenční alkylbenzensulfonáty a primární, sekundární a náhodné alkylsufláty s 11 až 18 atomy uhlíku, alkylalkoxysulfáty s 10 až 18 atomy uhlíku, alkylpolyglykosidy a jejich odpovídající sulfatované polyglykosidy s 10 až 18 atomy uhlíku, α-sulfonované estery mastných kyselin s 12 až 18 atomy uhlíku a alkyl (s 12 až 18 atomy uhlíku) a alkylfenolalkoxyláty (zvláště ethoxyláty a směsné ethoxy/propoxy), betainy a sulfobetainy ("sultainy") s 12 až 18 atomy uhlíku, aminoxidy s 10 až 18 atomy uhlíku, sarkosináty s 8 až 24 atomy uhlíku (zvláště oleylsarkosináty) a podobné. Seznamy dalších konvenčních užitečných povrchově aktivních činidel jsou uvedeny ve standardních textech.

Jedna skupina neiontových povrchově aktivních činidel zvláště užitečných podle vynálezu zahrnuje činidla typu amidů mastných polyhydroxykyselin obecného vzorce



v němž R^1 znamená atom vodíku, uhlovodíkovou skupinu s 1 až 8 atomy uhlíku, 2-hydroxyethylovou skupinu, 2-hydroxypropylovou skupinu nebo jejich směs, s výhodou alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, výhodněji alkylovou skupinu s 1 nebo 2 atomy uhlíku, nejvýhodněji alkylovou skupinu s 1 atomem uhlíku (tj. methylovou), R^2 znamená uhlovodíkovou skupinu s 5 až 32 atomy uhlíku, s výhodou alkylovou skupinu nebo alkenylovou skupinu s přímým řetězcem se 7 až 19 atomy uhlíku, výhodněji alkylovou skupinu nebo alkenylovou skupinu s přímým řetězcem s 9 až 17 atomy uhlíku, nejvýhodněji alkylovou skupinu nebo alkenylovou skupinu s přímým řetězcem s 11 až 19 atomy uhlíku nebo jejich směs a Z znamená polyhydroxyuhlovodíkovou skupinu s lineárním uhlovodíkovým řetězcem s alespoň 2 (v případě glyceraldehydu) nebo alespoň 3 (v případě jiných redukujících cukrů) hydroxylovými skupinami přímo spojenými s řetězcem nebo jejich alkoxylo-

vaný derivát (s výhodou ethoxylovaný nebo propoxylovaný). Z s výhodou znamená skupinu, která je odvozena od redukujícího cukru v reduktivní aminační reakci, výhodněji Z znamená glycitylovou skupinu. Mezi vhodné redukující cukry patří glukosa, fruktosa, maltosa, laktosa, galaktosa, manosa a xylosa a také glyceraldehyd. Jako surovina se může používat kukuřičný sirup s vysokým obsahem dextrosy, kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktosy, kukuřičný sirup s vysokým obsahem maltosy a také jednotlivé shora uvedené cukry. Tyto kukuřičné sirupy mohou poskytovat směs cukerných složek pro Z. Tomu by mělo být porozuměno tak, že uvedené nevylučuje jiné vhodné suroviny. Z znamená s výhodou skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající ze skupiny $-CH_2-(CHOH)_n-CH_2OH$, $-CH(CH_2OH)-(CHOH)_{n-1}-CH_2OH$, $-CH_2-(CHOH)_2(CHOR')(CHOH)-CH_2OH$, v nichž n znamená číslo od 1 do 5 a R' znamená atom vodíku nebo cyklický mono- nebo poly-sacharid a jeho alkoxylovaný derivát. Nejvýhodnější jsou glycityly, v nichž n znamená číslo 4, zvláště $-CH_2-(CHOH)_4CH_2OH$.

V obecném vzorci I R^1 může znamenat např. N-methylovou, N-ethylovou, N-propylovou, N-isopropylovou, N-butylovou, N-isobutylovou, N-2-hydroxyethylovou nebo N-2-hydroxypropylovou skupinu. Pro nejvyšší pěnění R^1 s výhodou znamená methylovou nebo hydroxyalkylovou skupinu. Jestliže je žádoucí nižší pěnění, R^1 s výhodou znamená alkylovou skupinu se 2 až 8 atomy uhlíku, zvláště propylovou, isopropylovou, butylovou, isobutylovou, pentylovou, hexylovou a 2-ethylhexylovou skupinu.

Skupina $R^2-COON<$ může znamenat kokosový amid, stearamid, oleamid, lauramid, myristamid, palmitamid, lojový amid atd.

Jinou skupinou neiontových povrchově aktivních činidel užitečných podle předloženého vynálezu jsou kondenzáty ethylenoxidu s hydrofobní částí, čímž se získá povrchově aktivní činidlo s průměrnou HLB od 5 do 17, s výhodou od 6 do 14, výhodněji od 7 do 12. Hydrofobní (lipofilní) část může být svojí povahou alifatická nebo aromatická. Délka polyoxyethylenové skupiny, která je zkondenzována s příslušnou hydrofobní skupinou,

se může snadno upravit tak, aby poskytla ve vodě rozpustnou sloučeninu se žádoucím stupněm rovnováhy mezi hydrofilními a hydrofobními prvky.

Zvláště výhodnými neiontovými povrchově aktivními činidly tohoto typu jsou ethoxyláty primárních alkoholů s 9 až 15 atomy uhlíku se 3 až 8 moly ethylenoxidu na mol alkoholu, zvláště primární alkoholy se 14 až 15 atomy uhlíku se 6 až 8 moly ethylenoxidu na mol alkoholu, primární alkoholy s 12 až 15 atomy uhlíku se 3 až 5 moly ethylenoxidu na mol alkoholu a jejich směsi.

Případné detergentní složky používané podle předloženého vynálezu obsahují anorganické a/nebo organické čistící stavební složky, které pomáhají při regulaci minerální tvrdosti. Jestliže se používají, tyto složky jsou v prostředcích obsaženy v množství od 5 do 80 % hmotn. z detergentních prostředků.

Mezi anorganické čistící stavební složky patří, ale nejsou na ně omezeny, soli polyfosforečnanu s alkalickými kovy a amoniové a alkanolamoniové soli (příklady jsou trifosforečnany a difosforečnany a sklovité polymerní metafosforečnany), fosfonáty, kyselina fytová, křemičitany, uhličitany (včetně hydrogenuhličitanů a polouhličitanů), sulfáty a hlinitokřemičitany. V některých místech jsou však vyžadovány nefosforečnanové stavební složky.

Příklady křemičitanových stavebních složek jsou křemičitany alkalických kovů, zvláště těch, jejichž poměr SiO_2:Na_2O je v rozmezí od 1,6:1 do 3,2:1, a vrstevnaté křemičitany, jako jsou vrstevnaté křemičitany sodné popsané v USA patentu číslo 4 664 839, vydaném 12. května 1987, H.P.Riecka, dostupné od Hoechst pod obchodním označením "SKS". Zvláště výhodnou stavební složkou typu vrstevnatého křemičitanu je SKS-6.

Uhličitanové stavební složky, zvláště jemně rozemletý uhličitan vápenatý s plochou větší než 10 m^2/g, jsou výhodnými stavebními složkami, které se mohou používat v granulovaných

prostředcích. Hustota detergentů na základě těchto uhličitanů alkalického kovu může být v rozmezí od 450 do 850 g/l s obsahem vlhkosti s výhodou pod 4 % hmotn.

Příklady uhličitanových stavebních složek jsou uhličitany alkalických zemin a alkalických kovů, jak jsou popsány v SRN patentové přihlášce 2 321 001, publikované 15. listopadu 1973.

Podle předloženého vynálezu jsou zvláště užitečné hlinitokřemičitanové stavební složky. Výhodné hlinitokřemičitany jsou zeolitové stavební složky obecného vzorce

$$Na_z[(AlO_2)_z\ (SiO_2)_y]\ .xH_2O \quad ,$$

v němž z a y znamenají alespoň číslo 6, molární poměr z k y je v rozmezí od 1,0 do 0,5 a x znamená číslo od 15 do 264.

Užitečné hlinitokřemičitanové iontoměničové materiály jsou komerčně dostupné. Tyto hlinitokřemičitany mohou být krystalické nebo amorfní, může jít o přirozeně se vyskytující hlinitokřemičitany nebo syntetické hlinitokřemičitany. Způsoby výroby hlinitokřemičitanových iontoměničových materiálů jsou popsány v USA patentu 3 985 669 Krummela a spol., vydaném 12. října 1976, a v USA patentu 4 605 509 Corkilla a spol., vydaném 12. srpna 1986. Výhodné syntetické krystalické hlinitokřemičitanové iontoměničové materiály užitečné podle vynálezu jsou dostupné pod označeními zeolit A, zeolit P (B) (včetně těch, které jsou popsány v evropském spisu 384 070) a zeolit X. Hlinitokřemičitany mají s výhodou velikost částic v průměru 0,1 až 10 μm.

Mezi organická čistící stavební činidla vhodná pro účely podle předloženého vynálezu patří, ale nejsou na ně omezeny, rozmanité polykarboxylátové sloučeniny, jako jsou etherpolykarboxyláty včetně oxydisukcinátů, jak popsal Berg v USA patentu 3 128 287, vydaném 7. dubna 1964, a Lamberti a spol. v USA patentu 3 635 830, vydaném 18. ledna 1972. Viz také stavební složky "TMS/TDS" v USA patentu 4 663 071 Bushe a spol., z 5. května 1987. Mezi vhodné etherové polykarboxyláty patří také cyklické sloučeniny, zvláště alicyklické sloučniny, jako jsou

ty, které jsou popsány v USA patentech 3 923 679, 3 835 163, 4 158 635, 4 120 874 a 4 102 903.

Mezi další čistící stavební složky patří etherhydroxypolykarboxyláty, kopolymery anhydridu kyseliny maleinové s ethylen- nebo vinyl-methyletherem, 1,3,5-trihydroxybenzen-2,4,6-trisulfonová kyselina a karboxymethyloxyjantarová kyselina, různé amoniové a substituované amoniové soli polyoctových kyselin a soli polyoctových kyselin s alkalickými kovy, jako je ethylendiamintetraoctová kyselina a nitrilotrioctová kyselina, stejně jako polykarboxyláty, jako je kyselina mellitová, jantarová, oxydijantarová, polymaleinová, benzen-1,3,5-trikarboxylová, karboxymethyloxyjantarová a jejich rozpustné soli.

Výhodnými polykarboxylátovými stavebními složkami, které se mohou používat také v granulovaných prostředcích, zvláště v kombinaci se složkami jako je zeolit a/nebo vrstevnatý křemičitan, jsou citrátové stavební složky, např. kyselina citronová a její rozpustné soli (zvláště sodná sůl).

V detergentních prostředcích podle předloženého vynálezu jsou vhodné také 3,3-dikarboxy-4-oxa-1,6-hexandioáty a podobné sloučeniny popsané v USA patentu 4 566 984 Bushe, vydaném 28. ledna 1986.

V situacích, kdy se mohou používat stavební složky odvozené od fosforu, a zvláště v prostředku ve formě kostek používaných pro mytí rukou, lze používat různé fosforečnany alkalických kovů, jako jsou dobře známé tripolyfosforečnany sodné, difosforečnan sodný a orthofosforečnan sodný. Mohou se používat také fosfonátové stavební složky, jako je ethan-1-hydroxy-1,1--difosfonát a další známé fosfonáty (viz například USA patenty 3 159 581, 3 213 030, 3 422 021, 3 400 148 a 3 422 137).

Ve výhodném provedení mohou být konvenční detergentní složky používané podle vynálezu vybrány z typických složek detergentních prostředků, jako jsou čistící povrchově aktivní

činidla a čistící stavební složky. Detergentní složky mohou popřípadě zahrnovat jedno nebo více čistících doplňkových činidel nebo jiných materiálů pro napomáhání nebo zvýšení účinnosti čištění, vyčištění substrátu nebo pro úpravu estetického vzhledu detergentního prostředku. Mezi obvyklé čistící doplňky detergentních prostředků patří složky uvedené v USA patentu č. 3 936 537 Baskervilleho a spol., který je zde zahrnut jako odkaz. Mezi tyto doplňky, které mohou být zahrnuty v detergentních prostředcích používaných podle předloženého vynálezu v množstvích konvenčně určených podle znalostí z oblasti techniky (obvykle od 0 do 20, s výhodou od 0,5 do 10 % hmotn. z hmotnosti detergentních složek), patří obarvovače, zesilovače pěnění, potlačovatelé pěnění, činidla působící proti ztrátě lesku a/nebo protikorozní činidla, činidla suspendující ušpinění, činidla uvolňující ušpinění, barviva, plnidla, optická zjasňovadla, germicidy, zdroje alkality, hydrotropy, antioxidační činidla, parfémy, rozpouštědla, solubilizující činidla, činidla působící odstraňování a/nebo proti zpětnému ukládání ušpinění hlinkami, polymerní dispergační činidla, pomocná činidla pro opracování, avivážní složky (např. smektitové hlinky), činidla inhibující přenos barev (např. polyvinylpyrrolidony), činidla pro regulaci statické elektřiny atd.

Bělící systémy popřípadě, ale s výhodou, budou obsahovat také komplexotvorná činidla, které nejen že zvyšují stabilitu bělícího činidla odstraňováním iontů těžkých kovů, které mají tendenci rozkládat bělící činidla, ale spolupůsobí také při odstraňování polyfenolových skvrn, jako jsou skvrny od čaje a podobné. Pro toto použití jsou známa různá komplexotvorná činidla, včetně aminofosfonátů, dostupná jako Dequest od firmy Monsanto, nitrilotriacetáty, hydroxyethyl-ethylendiamintriacetáty a podobná. Mezi výhodná, biodegradovatelná, nefosforová komplexační činidla patří ethylendiamindisukcináty ("EDDS", viz USA patent 4 704 233 Hartmana a Perkinse), ethylendiamin-N,N'-diglutamát (EDDG) a 2-hydroxypropylendiamin-N,N'-disukcinát (HPDDS). Tato komplexotvorná činidla se mohou používat jako soli s alkalickými kovy nebo soli s kovy alkalických zemin,

typicky v množství od 0,1 do 10 % hmotn. z hmotnosti předložených prostředků.

Prostředky podle předloženého vynálezu jsou specificky užitečné jako konvenční prací detergentní prostředky, jako jsou ty, které lze typicky nalézt v granulovaných prostředcích nebo v kostkách určených pro praní. USA patent 3 178 370 Okenfusse, vydaný 13. dubna 1965, popisuje detergentní kostky pro praní a způsob jejich výroby. Filipinský patent 13 778 Andersona, vydaný 23. září 1980, popisuje syntetické detergentní kostky pro praní. Způsoby výroby detergentních kostek pro praní různými způsoby vytlačování jsou dobře známy odborníkům z oblasti techniky.

Následující příklady jsou uvedeny jako další ilustrace předloženého vynálezu, ale nejsou zamýšleny jako jeho omezení.

Příklad 1

Připraví se granulovaný detergentní prostředek, který obsahuje následující složky.

složka	% hmotn.
lineární alkyl(s 12 at. uhlíku)benzensulfonát sodný	22
fosforečnan (jako tripolyfosforečnan sodný)	30
uhličitan sodný	14
křemičitan sodný	3
proteasa č. 12	0,3
peruhličitan sodný	5
ethylendiamindisukcinátové komplexotvorné činidlo (EDDS)	0,4
síran sodný	5,5
nonanoylkaprolaktam	5
plnidlo* a voda	doplnit do 100

* Lze vybrat z konvenčních materiálů, jako je uhličitan vápena-

tý, talek, hlinka, křemičitany a podobné.

Připraví se vodné směsi složek detergentních prostředků stabilních vůči teplu a alkaliím, vysuší se rozprášením a přimíchají se další přísady, takže prostředek obsahuje shora uvedené složky v uvedených množstvích.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 2

Připraví se granulovaný detergentní prostředek, který obsahuje následující složky.

složka	% hmotn.
aniontový alkylsulfát	7
neiontové povrchově aktivní činidlo	5
zeolit (0,1 až 10 μm)	10
citrát trojsodný	2
křemičitanová stavební složka SKS-6	10
polymer akrylát/maleinát	4
nonanoylkaprolaktam	5
peruhličitan sodný*	15
uhličitan sodný	5
ethylediamindisukcinátové komplexotvorné činidlo (EDDS)	0,4
potlačovatel pěnění	2
proteasa č. 12	0,3

složka	% hmotn.
lipasa	0,3
činidlo uvolňující ušpinění	0,2
minoritní složky** a voda	doplnit do 100

* Průměrná velikost částic 400 až 1200 μm.

** Lze vybrat z vhodných materiálů, jako je uhličitan vápenatý, talek, hlinka, křemičitany apod.

Připraví se vodné směsi složek detergentního prostředku stabilního vůči teplu a alkaliím, vysuší se rozprášením a přimíchají se další přísady, takže prostředek obsahuje shora uvedené složky v uvedených množstvích.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 3

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 2 se připraví detergentní prostředek s tím, že nonanoylkaprolaktam se nahradí 15 % hmotn. směsi 1:1:1 benzoylkaprolaktamu, nonanoylkaprolaktamu a (6-nonanamidokaproyl)oxybenzensulfonátu a že množství peruhličitanu sodného je 30 % hmotn.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy

č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 4

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 1 se připraví detergentní prostředek s tím, že nonanoylkaprolaktam se nahradí 20 % hmotn. směsi 1:1:1 benzoylkaprolaktamu, nonanoylkaprolaktamu a (6-nonanamidokaproyl)oxybenzensulfonátu a že množství peruhličitanu sodného je 20 % hmotn. a množství fosforečnanu je 0 % hmotn.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 5

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 2 se připraví detergentní prostředek s tím, že nonanoylkaprolaktam se nahradí stejným množstvím aktivátoru benzoxainového typu.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 6

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 2 se připraví detergentní prostředek s tím, že nonanoylkaprolaktam se nahradí 10 % hmotn. směsi 1:1 aktivátoru typu benzoxazinu a tetraacetylethylendiaminu a že množství peruhličitanu sodného je 25 % hmotn.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 7

Kostka pro praní vhodná pro ruční praní ušpiněných látek se vyrobí standardním vytlačovacím postupem. Tato kostka obsahuje:

složka	% hmotn.
lineární alkyl(s 12 at. uhlíku)benzensulfonát sodný	30
fosforečnan (jako trifosforečnan sodný)	7
uhličitan sodný	25
difosforečnan sodný	7
kokosový monoethanolamid	2
zeolit A (0,1 až 10 μm)	5
karboxymethylcelulosa	0,2
polyakrylát (mol. hmotn. 1400)	0,2
(6-nonanamidokaproyl)oxybenzensulfonát	5
peruhličitan sodný	5
zjasňovací činidlo, parfém	0,2
proteasa č. 12	0,3**

složka	% hmotn.
lipasa	0,3
síran vápenatý	1
síran hořečnatý	1
voda	4
plnidlo*	doplnit do 100

* Lze vybrat z konvenčních materiálů, jako je uhličitan vápenatý, talek, hlinka, křemičitany a podobné.
** Znamená mg aktivního enzymu na gram prostředku.

Detergentní prací kostky se vyrobí konvenčním způsobem výroby mýdlových nebo detergentních kostek obvyklým v oblasti techniky.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 8

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 7 se připraví detergentní prostředek s tím, že (6-nonanamidokaproyl)oxybenzensulfonát se nahradí ekvivalentním množstvím benzoylkaprolaktamu.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě po-

dobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 9

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 7 se připraví detergentní prostředek s tím, že (6-nonanamidokaproyl)oxybenzensulfonát se nahradí ekvivalentním množství nonanoylkaprolaktamu.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 10

Připraví se granulovaný detergentní prostředek, který obsahuje následující složky.

složka	% hmotn.
aniontový alkylsulfát	7
neiontové povrchově aktivní činidlo	5
zeolit (0,1 až 10 μm)	10
citrát trojsodný	2
křemičitanová stavební složka SKS-6	10
polymer akrylát/maleinát	4
nonanoylkaprolaktam	5
peruhličitan sodný*	15
uhličitan sodný	5

složka	% hmotn.
ethylediamindisukcinátové komplexotvorné činidlo (EDDS)	0,4
potlačovatel pěnění	2
proteasa č. 12	0,5
činidlo uvolňující ušpinění	0,2
minoritní složky, plnidlo** a voda	doplnit do 100

* Průměrná velikost částic 400 až 1200 μm.

** Lze vybrat z vhodných materiálů, jako je uhličitan vápenatý, talek, hlinka, křemičitany apod.

Připraví se vodné směsi složek detergentního prostředku stabilního vůči teplu a alkaliím, vysuší se rozprášením a přimíchají se další přísady, takže prostředek obsahuje shora uvedené složky v uvedených množstvích.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 11

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 10 se připraví detergentní prostředek s tím, že nonanoylkaprolaktam se nahradí ekvivalentním množstvím benzoylkaprolaktamu.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány

v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 12

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 10 se připraví detergentní prostředek s tím, že nonanoylkaprolaktam se nahradí 15 % hmotn. (6-nonanamidokaproyl)oxybenzensulfonátu a že množství peruhličitanu sodného je 30 % hmotn.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 13

Stejným postupem jako je shora uvedeno v příkladu 10 se připraví detergentní prostředek s tím, že nonanoylkaprolaktam se nahradí 15 % hmotn. aktivátoru benzoxazinového typu a že množství peruhličitanu sodného je 30 % hmotn.

V tomto příkladu se proteasami č. 1 až 11 a 13 až 25 uvedenými v tabulce III, zahrnující mimo jiné další proteasy, které jsou užitečné v předloženém vynálezu a které jsou popsány v tabulkách V a VI, substituuje protesa č. 12 s v podstatě podobnými výsledky. Také v tomto příkladu se substitucí proteasy č. 12 jakoukoliv kombinací proteas užitečných podle předloženého vynálezu a uvedených v tabulkách III, V a VI, mimo jiné, získají v podstatě podobné výsledky.

Příklad 14

Test účinnosti praní

Účinnost praní variant užitečných v prostředcích podle předloženého vynálezu se vyhodnocuje měřením odstranění skvrn z EMPA 116 (krev, mléko, saze na bavlně) kousků látek (Testfabrics, Inc., Middlesex, N.J. 07030, USA).

Šest EMPA 116 kousků rozstříhaných na velikost 7,5 krát 11,2 cm s perforovanými okraji se umístí do kelímků zařízení Model 7243S Terg-O-Tometer (United States Testing Co., Inc., Hoboken, N.J., USA) obsahujících 1000 ml vody o tvrdosti 15 gpg (poměr hmotností vápenatých k hořečnatým iontům 3:1), 7 g pracího činidla a příslušné množství enzymu. Podstatou detergentního činidla je WFK1 od wfk-Testgewebe GmbH, Adlerstrasse 42, Postfach 13 07 62, D-47759 Krefeld, Německo:

složka	% hmotn. v konečném produktu
zeolit A	25
síran sodný	25
uhličitan sodný	10
lineární alkylbenzensulfonát	8,8
alkoholethoxylát (7-8 EO)	4,5
sodné mýdlo	3
křemičitan sodný (SiO_2:Na_2O v poměru 3,3:1)	3

K tomuto základu detergentu se přidají následující složky:

složka	% hmotn. v konečném produktu
monohydrát perboritanu sodného	13
kopolymer (Sokalan CP5)	4
TAED (Mykon ATC Green)	3
enzym	0,5
zjasňovací činidlo (Tinopal AMS-GX)	0,2

Monohydrát perboritanu sodného se získá od Degussa Corporation, Ridgefield-Park, N.J. 07660, USA. Sokalan CP5 se získá od BASF Corporation, Parsippany, N.J. 07054. Mykon ATC Green (TAED, tetracetylethylendiamin) se získá od Warwick International, Limited, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, Anglie. Tinopal AMS GX se získá od Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, N.C. 27419, USA.

Šest EMPA 116 kousků se pere v detergentu s enzymem 30 minut při 60 °C, potom se máchá dvakrát 5 minut v 1000 ml vody. Enzymy se přidávají na konečnou koncentraci od 0,05 do 1 ppm pro standardní křivky a 0,25 ppm pro rutinní analýzu. Kousky se vysuší a vyždímají a odrazivost od kousků se měří hodnotou L na $L^*a^*b^*$ stupnici přístroje Minolta Chroma Meter, Model CR-200 (Minolta Corporation, Ramsey, N.J. 07446, USA). Účinnost se popisuje jako procento účinnosti B. lentus (GG36) proteasy a vypočte se podělením množství B. lentus (GG36) proteasy množstvím variantní proteasy, kterého je potřeba k dosažení stejného odstranění skvrn krát 100. Data jsou uvedena v tabulce VII.

Tabulka VII

enzym	účinnost praní
B. lentus subtilisin	100
N76D	310
N76D/S103A	230
N76D/V104I	130
N76D/I107V	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
N76D/S103A/V104I/T260P	280
N76D/S103A/V104I/S265N	190

PV
1052-96
URAD PRŮMYSLOVÉHO
31. V. 96
DOŠLO
040

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Bělící prostředky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahují:

a) efektivní množství proteasového enzymu, kterým je varianta karbonylové hydrolasy se sekvencí aminokyselin, která se v přírodě nevyskytuje a která je odvozena náhradou různých aminokyselin prekursorové karbonylové hydrolasy různými zbytky aminokyselin, v takové poloze prekursorové karbonylové hydrolasy, která odpovídá poloze +76 Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu v kombinaci s jednou nebo více polohami zbytků aminokyselin, které odpovídají polohám vybraným ze skupiny sestávající z +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 a +274 Bacillus amyloliquefaciens subtilisinu,

b) bělící činidlo, kterým je buď organická perkyselina nebo kombinace aktivátoru bělícího činidla a persloučeniny schopná poskytovat peroxid vodíku, který může reagovat s aktivátorem za vzniku organické perkyseliny in situ v bělícím roztoku vytvořeném z prostředku, a

c) jeden nebo více materiálů čistícího prostředku slučitelných s proteasovým enzymem.

2. Bělící prostředky podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že materiály čistícího prostředku jsou vybrány ze skupiny, která sestává z povrchově aktivních činidel, rozpouštědel, pufrů, enzymů, činidel uvolňujících ušpinění, činidel uvolňujících ušpinění hlinkami, dispergačních činidel, zjasňovacích činidel, potlačovatelů pěnění, avivážních činidel, podněcovatelů pěnění, stabilizátorů enzymů, stavebních složek, barviv, parfémů a jejich směsí.

3. Bělící prostředky podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jsou ve formě, která je užitečná jako pro-

středek pro čištění látek, který obsahuje alespoň jedno povrchově aktivní činidlo.

4. Bělící prostředky podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahují alespoň 5 % hmotn. povrchově aktivního činidla, které je vybráno ze skupiny sestávající z alkylbenzensulfonátů, primárních alkylsulfátů, sekundárních alkylsulfátů, alkylalkoxysulfátů, alkylalkoxykarboxylátů, alkylpolyglykosidů a jejich odpovídajících sulfatovaných polyglykosidů, esterů α-sulfonovaných mastných kyselin, alkyl a alkylfenolalkoxylátů, betainů a sulfobetainů, aminoxidů, N-methylglukamidů, neiontových primárních alkoholethoxylátů, směsných ethoxy/propoxylátů neiontových primárních alkoholů a jejich směsí.

5. Bělící prostředky podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahují alespoň 5 % hmotn. stavební složky, která je vybrána se skupiny sestávající ze zeolitů, polykarboxylátů, vrstevnatých křemičitanů, fosforečnanů a jejich směsí.

6. Bělící prostředky podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jsou ve formě koncentrovaného granulovaného prostředku pro čištění látek, který obsahuje alespoň 30 % hmotn. povrchově aktivního činidla.

7. Bělící prostředky podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že materiály čistícího prostředku obsahují alespoň jeden enzym, který je vybrán ze skupiny sestávající z celulas, lipas, amylas, proteas, peroxidas a jejich směsí.

8. Bělící prostředky podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jsou ve formě kapalného prostředku pro čištění látek, který obsahuje alespoň jedno rozpouštědlo a alespoň jedno povrchově aktivní činidlo.

9. Bělící prostředky podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahují vodu a alespoň 5 % hmotn. povrchově aktivního činidla.

10. Bělící prostředky podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že materiály čistícího prostředku obsahují alespoň jedno avivážní činidlo.

11. Čistící prostředky podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že prekursorovou karbonylovou hydrolasou proteasového enzymu je subtilisin a proteasový enzym znamená variantu subtilisinu s kombinací substitucí provedených v polohách ekvivalentních polohám 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 a 76/103/ /104/128.

12. Čistící prostředky podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteasový enzym znamená variantu subtilisinu vybranou ze skupiny sestávající z 76/99, 76/101, 76/ /103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/

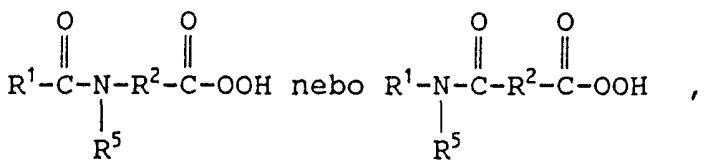
/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/ /104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/ /103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/ /123, 76/103/104/128, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/ /103/104/197, 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 a/nebo 76/103/104/222.

13. Prostředek pro čištění látek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) efektivní množství proteasového enzymu, kterým je varianta karbonylové hydrolasy se sekvencí aminokyselin, která se v přírodě nevyskytuje a která je odvozena od subtilisinové prekursorové karbonylové hydrolasy, kde proteasový enzym znamená subtilisovanou variantu vybranou ze skupiny sestávající z 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 a N76D/S103A/V104I/M222A a jejich směsí,

b) od 0,5 do 20 % hmotn. bělícího činidla, které je vybráno ze skupiny sestávající z:

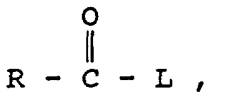
i) organické perkyseliny obecného vzorce



$R^1-C(=O)-N(R^5)-R^2-C(=O)-OOH$ nebo $R^1-N(R^5)-C(=O)-R^2-C(=O)-OOH$,

v nichž R^1 znamená alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^2 znamená alkylenovou, arylenovou nebo alkarylenovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku a R^5 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 10 atomy uhlíku a

ii) kombinace aktivátoru bělícího činidla a peroxidové sloučeniny schopné poskytovat peroxid vodíku, který může reagovat s aktivátorem za vzniku organické perkyseliny in situ v bělícím roztoku vytvořeném z prostředku, při čemž aktivátor bělícího činidla znamená sloučeninu obecného vzorce



v němž R znamená alkylovou skupinu s 5 až 18 atomy uhlíku, při čemž nejdelší lineární alkylový řetězec znamená řetězec od karbonylového atomu uhlíku s 6 až 10 atomy uhlíku a L znamená odcházející skupinu, jeho konjugát kyseliny má pKa v rozmezí od 4 do 13, a

c) jednoho nebo více materiálů čistícího prostředku slučitelných s tímto proteasovým enzymem a bělícím činidlem, obsahujících alespoň 5 % hmotn. povrchově aktivního činidla a alespoň 5 % hmotn. stavební složky z hmotnosti prostředku.

14. Prostředek pro čištění látek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje materiály čistícího prostředku vybrané ze skupiny, která sestává z rozpouštědel, pufrů, enzymů, činidel uvolňujících ušpinění, činidel uvolňujících ušpinění hlinkami, dispergačních činidel, zjasňovacích činidel, potlačovatelů pěnění, aviválních činidel, podněcovatelů pěnění, stabilizátorů enzymů, barviv, parfémů a jejich směsí.

15. Prostředek pro čištění látek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje alespoň jeden enzym, který je vybrán ze skupiny sestávající z celulas, lipas, amylas, proteas, peroxidas a jejich směsí.

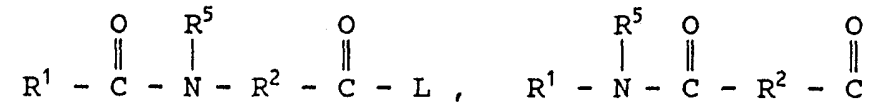
16. Prostředek pro čištění látek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je ve formě kapaliny, granulí nebo kostek.

17. Prostředek pro čištění látek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteasový enzym znamená variantu subtilisinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z 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 a jejich směsí.

18. Prostředek pro čištění látek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteasový enzym znamená variantu Bacillus subtilisinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z N76D/V104I, N76D/S103A/V104I a jejich směsí.

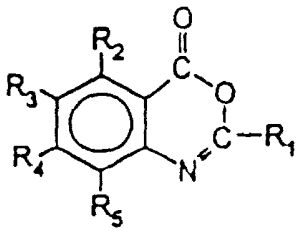
19. Prostředek pro čištění látek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje bělící činidlo obsahující alespoň 0,1 % hmotn. peroxidové bělící sloučeniny schopné poskytovat ve vodném prostředí peroxid vodíku a alespoň 0,1 % hmotn. jednoho nebo více aktivátorů bělícího činidla, při čemž tyto aktivátory bělícího činidla jsou členové vybraní ze skupiny sestávající z:

a) aktivátorů bělícího činidla obecného vzorce



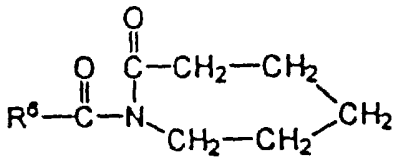
nebo jejich směsí, v nichž R^1 znamená alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^2 znamená alkylenovou, arylenovou nebo alkarylenovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^5 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 10 atomy uhlíku a L znamená odcházející skupinu,

b) aktivátorů bělícího činidla benzoxazinového typu obecného vzorce



v němž R_1 znamená atom vodíku nebo alkylovou, alkarylovou, arylovou nebo arylalkylovou skupinu a R_2, R_3, R_4 a R_5 mohou znamenat stejné nebo různé substituenty, které jsou vybrány ze skupiny sestávající z atomu vodíku, atomu halogenu, alkylové, alkenylové, arylové, hydroxylové, alkoxylové, aminové a alkylaminové skupiny, skupiny $-COOR_6$, kde R_6 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu, a karbonylové skupiny,

c) N-acyl-kaprolaktamových aktivátorů bělících činidel obecného vzorce



v němž R^6 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou, alkoxyarylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 12 atomy uhlíku, a

d) směsí a), b) a c).

20. Prostředek pro čištění látek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že odpovídající karboxylová kyselina organické perkyseliny bělícího činidla má hodnotu HLB v rozmezí od 3 do 6,5.

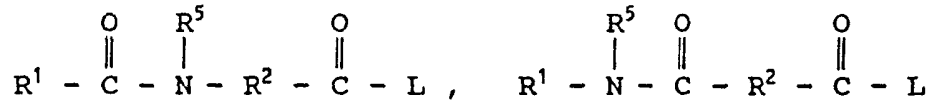
21. Prostředek pro čištění látek podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr mg proteasového enzymu na 100 g prostředku k ppm teoreticky dostupného kyslíku organické perkyseliny je v rozmezí od 1:1 do 20:1.

22. Prostředek pro čištění látek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) od 0,0001 do 10 % hmotn. proteasového enzymu, kterým je N76D/S103A/V104I varianta subtilisinu odvozená od Bacillus lentus subtilisinu,

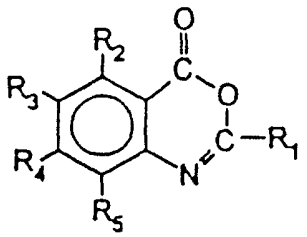
b) od 0,5 do 20 % hmotn. bělícího systému, který obsahuje alespoň 0,1 % hmotn. peroxidové bělící sloučeniny schopné poskytovat ve vodném prostředí peroxid vodíku a alespoň 0,1 % hmotn. jednoho nebo více aktivátorů bělícího činidla, při čemž tyto aktivátory bělícího činidla jsou členové vybraní ze skupiny sestávající z:

i) aktivátorů bělícího činidla obecného vzorce



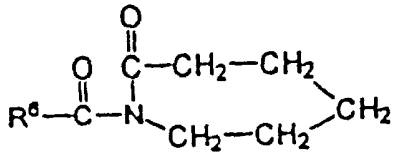
nebo jejich směsí, v nichž R^1 znamená alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^2 znamená alkylenovou, arylenovou nebo alkarylenovou skupinu s 1 až 14 atomy uhlíku, R^5 znamená atom vodíku nebo alkylovou, arylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 10 atomy uhlíku a L znamená odcházející skupinu,

ii) aktivátorů bělícího činidla benzoxazinového typu obecného vzorce



v němž R_1 znamená atom vodíku nebo alkylovou, alkarylovou, arylovou nebo arylalkylovou skupinu a R_2, R_3, R_4 a R_5 mohou znamenat stejné nebo různé substituenty, které jsou vybrány ze skupiny sestávající z atomu vodíku, atomu halogenu, alkylové, alkenylové, arylové, hydroxylové, alkoxylové, aminové a alkylaminové skupiny, skupiny $-COOR_6$, kde R_6 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu, a karbonylové skupiny,

iii) N-acyl-kaprolaktamových aktivátorů bělících činidel obecného vzorce



v němž R^6 znamená atom vodíku, alkylovou, arylovou, alkoxyarylovou nebo alkarylovou skupinu s 1 až 12 atomy uhlíku, a

iv) směsí i), ii) a iii),

c) alespoň 5 % hmotn. povrchově aktivního činidla,

d) alespoň 5 % hmotn. stavební složky a

e) popřípadě jeden nebo více materiálů čistícího prostředku slučitelných s proteasovým enzymem a bělícím systémem, které jsou vybrány ze skupiny, která sestává z rozpouštědel, pufrů, enzymů, činidel uvolňujících ušpinění, činidel uvolňujících ušpinění hlinkami, dispergačních činidel, zjasňovacích činidel, potlačovatelů pěnění, aviváž-ních činidel, podněcovatelů pěnění, stabilizátorů enzymů, barviv, parfémů a jejich směsí.

23. Prostředek pro čištění látek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že povrchově aktivní činidlo je vybráno ze skupiny, která sestává z alkylbenzensulfonátů, primárních alkylsulfátů, sekundárních alkylsulfátů, alkylalkoxysulfátů, alkylalkoxykarboxylátů, alkylpolyglykosidů a jejich odpovídajících sulfatovaných polyglykosidů, esterů α-sulfonovaných mastných kyselin, alkyl- a alkylfenol-alkoxylátů, betainů a sulfobetainů, aminoxidů, N-methylglukamidů, neiontových primárních alkoholethoxylátů, směsných ethoxy/propoxylátů neiontových primárních alkoholů a jejich směsí, při čemž další stavební složka je vybrána ze skupiny sestávající ze zeolitů, polykarboxylátů, vrstevnatých křemičitanů, fosfátů a jejich směsí.

24. Prostředek pro čištění látek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje alespoň asi 0,001 % hmotn. z hmotnosti čistícího prostředku alespoň jednoho enzymu, který je vybrán ze skupiny sestávají-

cí z proteas, amylas, lipas, celulas, peroxidas a jejich směsí.

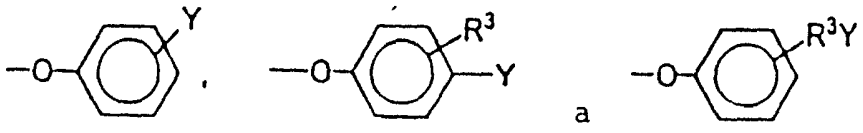
25. Prostředek pro čištění látek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivátor bělícího činidla je vybrán ze skupiny sestávající z benzoylkaprolaktamu, nonanoylkaprolaktamu, (6-nonanamidokaproyl)oxybenzensulfonátu a jejich směsí.

26. Prostředek pro čištění látek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peroxidová bělící sloučenina je vybrána ze skupiny sestávající z monohydrátu perboritanu sodného, tetrahydrátu perboritanu sodného, peroxyhydrátu difosforečnanu sodného, peroxyhydrátu močoviny, peruhličitanu sodného, peroxidu sodného a jejich směsí.

27. Prostředek pro čištění látek podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že molární poměr peroxidu vodíku a aktivátoru bělícího činidla je větší než 1,0.

28. Prostředek pro čištění látek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R^1 znamená alkylovou skupinu s 6 až 12 atomy uhlíku, R^2 znamená skupinu s 1 až 8 atomy uhlíku a R^5 znamená atom vodíku nebo methylovou skupinu.

29. Prostředek pro čištění látek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R^1 znamená alkylovou skupinu se 7 až 10 atomy uhlíku, R^2 znamená skupinu se 4 až 5 atomy uhlíku a L znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající ze skupin obecných vzorců



v nichž R^3 znamená alkylový řetězec s 1 až 8 atomy uhlíku a Y znamená skupinu $-SO_3^-M^+$ nebo $-CO_2^-M^+$, v nichž M znamená

atom sodíku nebo draslíku.

30. Prostředek pro čištění látek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že N-acylkaprolaktam je vybrán ze skupiny sestávající z benzoylkaprolaktamu, oktanoylkaprolaktamu, nonanoylkaprolaktamu, 3,5,5-trimethylhexanoylkaprolaktamu, dekanoylkaprolaktamu, undecenoylkaprolaktamu a jejich směsí.

31. Způsob čištění látek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se látka, která potřebuje vyčistit, uvede do kontaktu s pracím roztokem, který obsahuje efektivní množství prostředku podle nároku 1.

32. Způsob čištění látek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se látka, která potřebuje vyčistit, uvede do kontaktu s pracím roztokem, který obsahuje efektivní množství prostředku podle nároku 22.